

Aus dem
CharitéCentrum 15 für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie mit Lehrstuhl für Experimentelle Neurologie
Direktor: Prof. Dr. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Tierexperimentelle und klinische Aspekte zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls: Ischämietoleranz und prähospitale Schlaganfalltherapie

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Alexander Kunz
geboren in Königs Wusterhausen

Eingereicht: Oktober 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Köhrmann, Essen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Arnold, Bern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1 Der ischämische Schlaganfall	5
1.2 Toleranz im Gehirn	7
1.3 Prähospitaler Schlaganfalltherapie im Stroke-Einsatzmobil (STEMO)	10
1.4 Fragestellungen	14
2. Eigene Arbeiten	15
2.1 Von iNOS stammendes NO und von NOX2 stammendes Superoxid vermitteln Toleranz gegenüber exzitotoxischer Hirnschädigung durch Bildung von Peroxynitrit .	15
2.2 Neurovaskuläre Protektion durch ischämische Toleranz: die Rolle von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoff-Spezies	27
2.3 Lipopolysaccharid induziert frühe Toleranz gegenüber Exzitotoxizität durch Stickstoffmonoxid und cGMP	40
2.4 Bilateraler Verschluss der A. carotis communis ist ein adäquater präkonditionierender Stimulus zur Induktion früher ischämischer Toleranz gegenüber fokaler zerebraler Ischämie	47
2.5 Funktionelle Folgen von prähospitaler Thrombolyse in einem Schlaganfallmobil im Vergleich zur konventionellen Versorgung: eine Beobachtungs- und Register-Studie	55
2.6 Effekte der ultrafrühen intravenösen Thrombolyse auf die Folgen des ischämischen Schlaganfalls: Die STEMO (Stroke-Einsatzmobil)-Gruppe	66
3. Diskussion	71
3.1 Toleranz im Gehirn	71
3.1.1 Frühe Toleranz	71
3.1.2 Späte Toleranz	73
3.1.3 Translationale Aspekte	76
3.2 Prähospitaler Schlaganfalltherapie im STEMO	81
3.2.1 Einfluss der prähospitalen Behandlung des ischämischen Schlaganfalls auf das funktionelle Langzeitergebnis	81
3.2.2 Aktuelle Entwicklungen und Perspektiven der prähospitalen Schlaganfallbehandlung an Bord einer MSU	85
4. Zusammenfassung	91
5. Literaturangaben	93
Danksagung	101
Eidesstattliche Erklärung	102

Abkürzungen (in alphabetischer Reihenfolge):

3-NT	3-Nitrotyrosin
7-NI	7-Nitroindazol
AG	Aminoguanidin
ATP	Adenosintriphosphat
BCCAO	engl.: bilateral common carotid artery occlusion
BEST-MSU	engl.: Benefits of Stroke Treatment Delivered Using a Mobile Stroke Unit (Studie)
B_PROUD	engl.: Berlin Prehospital Or Usual Delivery of acute stroke care (Studie)
CBF	engl.: cerebral blood flow
C-CBF	Charité – Campus Benjamin Franklin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Computertomographie
CTA	CT-Angiographie
CVR	engl.: cerebrovascular regulation
DALY	engl.: disability-adjusted life-years
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
DPTA NONOate	Dipropylenetriamine NONOate
DWI	diffusion-weighted imaging
eNOS	engl.: endothelial nitric oxide synthase
FeTPPS	Fe(III)5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato chloride
GWTG	engl.: Get With The Guidelines
HIF	engl.: hypoxia-inducible factor
iNOS	engl.: inducible nitric oxide synthase
INR	engl.: international normalized ratio
IT	Ischämietoleranz
LDF	engl.: laser-doppler flowmetry
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginin-Methyl-Ester
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	engl.: mitogen-activated protein
MCAO	engl.: middle cerebral artery occlusion
mitoK _{ATP}	mitochondrial lokalisierter ATP-abhängiger Kaliumkanal
mPTP	engl.: mitochondrial permeability transition pore
mRS	engl.: modified Rankin Scale
MRT	Magnetresonanztomographie
MSU	engl.: mobile stroke unit
MTRA	medizinisch-technischer Radiologieassistent
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NIHSS	engl.: National Institute of Health Stroke Scale
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	engl.: neuronal nitric oxide synthase

NNT	engl.: number needed to treat
NO	engl.: nitric oxide
NOS	engl.: nitric oxide synthase
nox2	NADPH-Oxidase 2
O ₂ ⁻	Superoxid-Ion
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PHANTOM-S	engl.: Pre-Hospital Acute Neurological Therapy and Optimization of Medical Care in Stroke Patients – Study (Studie)
POCT	engl.: point of care testing
PPSB	Prothrombin, Prokonvertin, Stuart-Prower-Faktor, antihämophiler Faktor B (Prothrombinkonzentrat)
PRESTO	engl.: Pre-hospital Stroke Treatment Organization (Studie)
RIPC	engl.: remote ischemic preconditioning
SAB	Subarachnoidalblutung
SITS-EAST	engl.: Safe Implementation of Treatments in Stroke – East (Register)
SITS-ISTR	engl.: Safe Implementation of Treatments in Stroke – International Stroke Thrombolysis Registry (Register)
SITS-MOST	engl.: Safe Implementation of Treatments in Stroke – Monitoring Study (Studie)
STEMO	engl.: stroke emergency mobile
TEA	Thrombendarteriektomie
TIA	transitorische ischämische Attacke

1. Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Ergebnisse der Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) haben gezeigt, dass der Schlaganfall weltweit weiterhin die zweithäufigste Todesursache darstellt¹. Gleichzeitig ist der Schlaganfall die zweithäufigste Ursache einer Beeinträchtigung des beschwerdefreien Lebens, gemessen anhand von behinderungsadjustierten Lebensjahren (engl. disability-adjusted life-years, DALY)². Im Jahre 2010 traten weltweit etwa 17 Millionen neue Schlaganfälle auf. Die Schlaganfall-Prävalenz lag im selben Jahr bei 33 Millionen Menschen¹. In Deutschland treten jährlich ca. 262.000 Schlaganfälle (Stand 2008) auf³. Abgesehen von den enormen sozialen Konsequenzen des Schlaganfalls für die Betroffenen und deren/dessen Angehörige, resultieren hieraus auch erhebliche Kosten. Anhand einer 2006 publizierten Studie belaufen sich die geschätzten Behandlungs- und Betreuungskosten für Patienten nach erstem ischämischen Schlaganfall allein in Deutschland für den Zeitraum 2006 bis 2025 auf insgesamt etwa € 109 Milliarden⁴.

Auch wenn in den Ländern mit hohen durchschnittlichen Einkommen zwischen 1990 und 2010 ein Rückgang der altersadjustierten Schlaganfall-Inzidenz und der Mortalitätsrate zu verzeichnen war, wird im globalen Maßstab vor dem Hintergrund der immer älter werdenden Bevölkerung und dem weiteren Bevölkerungswachstum, aber auch bedingt durch die zunehmende Prävalenz vaskulärer Risikofaktoren, wie dem Diabetes mellitus oder der arteriellen Hypertonie, in den kommenden Jahren mit einer weiteren Zunahme von Schlaganfall-Inzidenz und -Prävalenz zu rechnen sein¹.

Unter dem Begriff „Schlaganfall“ wird eine Gruppe von Erkrankungen des Gehirns zusammengefasst, bei der es durch eine zerebrale Minderdurchblutung zu akuten Funktionsstörungen im Gehirn kommt. Im Hinblick auf die grundlegend unterschiedlichen Behandlungsansätze werden zerebrale Ischämien (ischämischer Schlaganfall) von zerebralen Hämorrhagien (Hirnblutungen) abgegrenzt. Die relative Verteilung von ischämischen Schlaganfällen zu Hirnblutungen ist regional unterschiedlich. In Deutschland sind 85-90% aller Schlaganfälle Ischämien und 10-15% Hirnblutungen⁵.

Die Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls hat sich im vergangenen Vierteljahrhundert grundlegend gewandelt und fußt nunmehr auf fünf evidenzbasierten Prinzipien: (1) der (Thrombo)lysetherapie mit Alteplase in einem Zeitfenster von 4,5 Stunden nach bekannten Beginn der Symptomatik⁶, (2) der endovaskulären Thrombektomie bei Verschluss großen Arterien im vorderen Stromgebiet mittlerweile bis zu 24 Stunden nach Symptombeginn, die seit 2015 allein bzw. in Kombination mit der systemischen Lysetherapie zugelassen ist⁷⁻⁹, (3) der Behandlung von Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall in einer Schlaganfall-Einheit (engl. Stroke Unit)¹⁰, (4) der frühen Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern¹¹ und (5) der Hemikraniektomie bei raumfordernden Mediainfarkten^{12,13}.

Von diesen etablierten Therapiekonzepten haben nur die Lysetherapie und die endovaskuläre Thrombektomie das Potential, eine relevante Behinderung infolge des ischämischen Schlaganfalls zu verhindern. Ein Blick auf die Häufigkeiten der Anwendung

dieser beiden Behandlungsformen ist jedoch ernüchternd. So werden zwar beide Therapieoptionen insgesamt zunehmend häufiger eingesetzt. Die Häufigkeit der Anwendung der Lysetherapie liegt jedoch nur zwischen 4,5 und 11%, bezogen auf alle akuten ischämischen Schlaganfälle¹⁴⁻¹⁷. Eine endovaskuläre Thrombektomie erhalten dagegen lediglich 3,3% aller Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall¹⁸.

Wie effektiv wiederum sind nun Lyse- bzw. Thrombektomiebehandlung? Eine gepoolte Datenanalyse aus acht randomisierten kontrollierten Lysestudien ergab, dass die Anzahl der notwendigen Behandlungen (engl. number needed to treat, NNT) zur Verhinderung eines behindernden Schlaganfalls [entsprechend eines modified Rankin Scores (mRS) ≤ 1] für die Lysetherapie innerhalb von sechs Stunden nach Symptombeginn bei 12,6 liegt¹⁹. Dagegen müssen 5,3 Patienten zusätzlich zur systemischen Lysetherapie interventionell thrombektomiert werden, damit hierbei ein behindernder Schlaganfall (mRS ≤ 2) verhindert werden kann²⁰. Auch wenn insgesamt in den vergangenen Jahren steigende Behandlungszahlen sowohl für die Lysetherapie als auch, insbesondere seit Nachweis der Wirksamkeit durch nunmehr sieben multizentrische randomisierte kontrollierte Studien^{8,9,21-25}, für die endovaskuläre Thrombektomie zu verzeichnen ist, muss aus diesen Daten geschlussfolgert werden, dass sowohl von der Lysetherapie als auch von der endovaskulären Thrombektomie nur ein geringer Anteil der betroffenen Patienten profitiert.

In der Zusammenschau der bislang erwähnten Daten zum ischämischen Schlaganfall zeigt sich eine eindruckliche Diskrepanz zwischen einer im Trend immer häufiger werdenden Erkrankung mit hoher Mortalität und Morbidität und limitierten Behandlungsoptionen, von denen wiederum nur ein Bruchteil der Patienten profitiert.

Rationale für die in dieser Arbeit vorgestellten und diskutierten wissenschaftlichen Projekte war es, neue Strategien zu evaluieren, die in naher oder fernerer Zukunft dazu beitragen könnten, die Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall zu verbessern. Es wurden inhaltlich und methodisch zwei grundlegend unterschiedliche Themenfelder innerhalb der ischämischen Schlaganfallforschung bearbeitet: (1) Untersuchungen zur zerebralen Ischämietoleranz (IT) im tierexperimentellen Bereich und (2) Untersuchungen zur prähospitalen Lysetherapie im klinischen Bereich. Ziel der folgenden beiden Abschnitte ist es, diese beiden Themenfelder detaillierter vorzustellen.

1.2 Toleranz im Gehirn

„*Similia similibus curentur*“ (Hippokrates von Kos, ca. 460-370 v. Chr.)

Alle Organismen sind ganz unterschiedlichen elementaren Bedrohungen ausgesetzt²⁶. Dazu gehören unter anderem Ischämien, Infektionen oder Traumata²⁶. Im Lauf der Evolution haben sich jedoch intrinsische protektive Mechanismen entwickelt, die die schädlichen Folgen einer solchen Bedrohung abmildern oder möglicherweise verhindern sollen^{26,27}. Da das Gehirn nur sehr eingeschränkte Energiereserven hat und daher auf einen konstanten Blutfluss zur Versorgung mit Sauerstoff und Energiesubstraten angewiesen ist^{28,29}, sind diese protektiven Mechanismen hier besonders wichtig. Die Fähigkeit des Gehirns, durch die Aktivierung endogener adaptiver Mechanismen einen Zustand transient erhöhter Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Ischämie zu induzieren, wird als Ischämietoleranz (IT) bezeichnet³⁰. Um IT zu induzieren, bedarf es eines präkonditionierenden Stimulus³⁰. Die ischämische Präkonditionierung beschreibt einen Vorgang, bei der im zeitlichen Zusammenhang vor der eigentlichen zerebralen Ischämie ein kurzzeitiger milder ischämischer Stimulus auf das Gehirn einwirkt³⁰. Im Englischen wird hierbei meist von einer sogenannten „subletalen“ Ischämie gesprochen, da sie keinen Schaden im Hirnparenchym verursacht³⁰.

Das oben beschriebene der IT zugrunde liegende Prinzip ist offensichtlich schon seit langem bekannt. Das bezeugt unter anderem das diesem Abschnitt vorangestellte, von Hippokrates überlieferte, Zitat „*Similia similibus curentur*“: Gleiches wird geheilt durch Gleiches. Das Phänomen der zerebralen IT wurde *in vivo* erstmals im Jahre 1964 beschrieben³¹. Ein 1990 von Kazuo Kitagawa und Kollegen publizierter Artikel war es jedoch, der eine breite Aufmerksamkeit auf dieses Thema lenkte und zur Intensivierung der Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet führte^{32,33}. Kitagawa et al konnten an Wüstenrennmäusen nachweisen, dass Einwirkungen milder zerebraler Ischämien ein bzw. zwei Tage vor Induktion einer globalen zerebralen Ischämie den neuronalen Tod in der hippocampalen CA1-Region komplett verhindern können³³.

Neben dem Gehirn wurde das Vorhandensein von IT auch in anderen Organen, so z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber und Darm, nachgewiesen³⁴⁻³⁷.

IT im Gehirn kann neben der klassischen subletalen ischämischen Präkonditionierung auch durch andere potentiell schädliche, jedoch nicht-ischämische Stimuli induziert werden. Dieses Phänomen wird als Kreuztoleranz bezeichnet. Kreuztoleranz auslösende Stimuli sind z.B. Hyperthermie/Hypothermie, Hypoxie/Anoxie, „cortical spreading depression“, Epilepsie, Hirntrauma, Anästhetika, oxidativer Stress oder pro-inflammatorische Mediatoren³².

Hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs werden zwei unterschiedliche Arten von IT abgegrenzt: frühe und verzögerte IT^{26,30,32,38}. Frühe IT kann sich Minuten bis wenige Stunden nach dem präkonditionierenden Stimulus herausbilden. Dagegen dauert es mehrere Tage, bis sich verzögerte IT entwickelt²⁶. Die beiden unterschiedlichen IT-Arten unterscheiden sich auch hinsichtlich der zugrundeliegenden Mechanismen. Frühe IT benötigt keine *de novo* Proteinsynthese, vielmehr wird sie durch posttranslationale Modifikationen bereits

existierender Proteine vermittelt^{26,32}. Hieraus erklärt sich auch die kurze zeitliche Latenz, nach der frühe IT auftritt. Auf der anderen Seite ist frühe IT dadurch auch nur für eine relativ kurze Zeitspanne wirksam. Demgegenüber ist die Induktion von verzögerter IT von einer Protein-Neusynthese abhängig^{26,32}. Dies erklärt die längere Latenz, die es braucht, bis sich verzögerte IT einstellt. Dafür ist der protektive Effekt von verzögerter IT länger anhaltend als bei der frühen IT.

In vielen Studien der vergangenen Jahre wurden die Mechanismen, die IT induzieren, untersucht. Bis zum heutigen Tag sind dazu ganz unterschiedliche Mediatoren, Regulationen bzw. Signalkaskaden beschrieben worden. Zu den wichtigsten zählen hierbei Transkriptionsfaktoren, z.B. der hypoxia-inducible factor (HIF), spezifische Proteinkinase C-Isoenzyme, Adenosin-Rezeptoren, Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide, NO), genomische Reprogrammierung, sowie antiexzitotoxische, antiinflammatorische und antiapoptotische Mechanismen^{26,27,30,39}.

Die in dieser Arbeit vorgestellten tierexperimentellen Studien haben sich alle mit der Rolle von NO bei der zerebralen Toleranz beschäftigt⁴⁰⁻⁴³. NO ist ein hochreaktives Molekül, das frei im Gewebe diffundieren kann. Ihm werden im Gehirn sowohl protektive als auch toxische Eigenschaften zugeschrieben. Protektiv wirkt NO in seiner Eigenschaft als potenter Vasodilatator, der den zerebralen Blutfluss reguliert, die Thrombozytenaggregation und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion hemmt, sowie eine wichtige Rolle bei der neurovaskulären Kopplung spielt^{44,45}. Darüber hinaus ist NO bei der interzellulären Kommunikation und bei der synaptischen Plastizität wichtig⁴⁴. Auf der anderen Seite wird unter pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. nach einer zerebralen Ischämie, NO in größerer Menge synthetisiert und trägt dann zur Schädigung des Hirnparenchyms bei. Durch dessen hohe Affinität u.a. mit Superoxid sowie anderen reaktiven Sauerstoff-Spezies, sowie mit reaktiven Stickstoff-Spezies werden dann unter diesen Bedingungen große Mengen an potentiell neurotoxischen Verbindungen generiert^{26,44}.

NO wird aus L-Arginin und Sauerstoff unter dem Einfluss der NO-Synthase (NOS), einer Oxidoreduktase, synthetisiert^{26,44,46}. Die NOS ist im Gehirn in drei Isoenzymen vorhanden: der neuronalen NOS (nNOS), der endothelialen NOS (eNOS) und der induzierbaren bzw. ‚immunologischen‘ NOS (iNOS)^{26,46}.

Aktuell wissen wir, dass alle drei NOS-Isoenzyme für die Induktion von IT wichtig sind²⁶. Bis zur Veröffentlichung der in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Studien konnte beispielsweise in unterschiedlichen Studien gezeigt werden, dass die iNOS essentiell bei der verzögerten IT gegenüber einer fokalen zerebralen Ischämie ist. Dies konnte unter Verwendung unterschiedlicher präkonditionierender Stimuli (Isofluran-Inhalation, transiente globale Ischämie, Lipopolysaccharid-Injektion), unterschiedlicher Ischämiemodelle (permanente fokale zerebrale Ischämie, transiente fokale zerebrale Ischämie) und in verschiedenen Tierspezies (Ratte, Maus) nachgewiesen werden^{26,40,41,47-49}. Für die frühe IT wurde eine kritische Rolle von NO ebenfalls vermutet. Allerdings waren seinerzeit die experimentellen Daten zur Beteiligung der verschiedenen NOS-Isoenzyme weniger robust. Lediglich in einer Arbeit von Atochin und Kollegen wurde eine kritische Rolle von eNOS und

nNOS bei der frühen IT vermutet^{26,42,49}. Darüber hinaus waren die Mechanismen der durch NO vermittelten Protektion im Rahmen von früher bzw. verzögerter IT unklar⁴⁰⁻⁴².

Die Fragestellungen, die im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit bearbeitet wurden, sind im Abschnitt 1.4 (Seite 14) mit denen des klinischen Teils zusammengefasst.

1.3 Prähospitaler Schlaganfallbehandlung im Stroke-Einsatzmobil (STEMO)

“Time is brain!”⁵⁰

In Kapitel 1.1 wurde bereits erwähnt, dass für die Akuttherapie beim akuten ischämischen Schlaganfall heutzutage lediglich zwei kausale Therapieoptionen zur Verfügung stehen, die eine relevante Behinderung verhindern können: die systemische Lyse mit Alteplase und die endovaskuläre Thrombektomie. Im Mittelpunkt der in dieser Arbeit vorgestellten Studien zur prähospitalen Schlaganfallbehandlung im STEMO steht die systemische Lysetherapie. Daher werden im Folgenden auch ausschließlich Daten zur Lysetherapie erwähnt. Relevante Studien zur endovaskulären Thrombektomie werden im Diskussionsteil besprochen.

Ziel der systemischen Lysetherapie ist es, die, durch einen Gefäßverschluss verursachte, zerebrale Durchblutungsstörung wieder zu beheben. Hierbei spielt der Faktor ‘Zeit’ eine essentielle Rolle, dies spiegelt auch das mit der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls fest verwobene Konzept ‘time is brain’ wider. Aufgrund pathophysiologischer Überlegungen macht dieser zeitkritische Ansatz Sinn. Nach einem zerebralen Gefäßverschluss resultiert rasch ein Mangel an Energiesubstraten und Sauerstoff, in dessen Folge es zu einem Funktionsverlust im betroffenen Hirnparenchym kommt⁵¹. Dabei entstehen Hirnareale mit einer ausgeprägten Reduktion des zerebralen Blutflusses (engl.: cerebral blood flow, CBF) (Infarktkern) und Areale mit weniger kritischer CBF-Reduktion (Penumbra)^{51,52}. Das Parenchym im Infarktkern ist nicht mehr zu retten und geht rasch unter⁵¹. In der Penumbra dagegen ist der CBF auf der einen Seite so stark herabgesetzt, dass der Funktionsstoffwechsel des Hirnparenchyms nicht mehr aufrechterhalten werden kann, jedoch reicht die zerebrale Perfusion noch zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels aus⁵¹. Dadurch kann das Parenchym in der Penumbra zunächst noch überleben. Allerdings kommt es in der postischämischen Phase in der Penumbra zur Aktivierung zusätzlicher parenchymschädigender Signalkaskaden, wie beispielsweise Exzitotoxizität, Periinfarkt-Depolarisationen, Inflammation und Apoptose, die in der Folge dazu führen können, dass es bei persistierender zerebraler Durchblutungsstörung auch zum Untergang des Hirnparenchyms in der Penumbra kommt⁵¹. Mit der Lysetherapie soll also die gefährdete Penumbra vor dem Untergang bewahrt werden. Da die Gewebsschädigung in der Penumbra ein dynamischer Prozess ist, wird auch deutlich, dass die Wiederherstellung der zerebralen Durchblutung zeitkritisch ist.

Die Zeitabhängigkeit der Effektivität der Lysetherapie spiegelt sich auch in den publizierten klinischen Daten wider. So konnte beispielsweise in einer Metaanalyse von individuellen Patientendaten aus neun abgeschlossenen randomisierten, kontrollierten Lysestudien gezeigt werden, dass Alteplase-Behandlung innerhalb von 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik die Wahrscheinlichkeit für ein gutes Endergebnis nach ischämischem Schlaganfall erhöht und dass eine frühere Behandlung mit größeren proportionalen Vorteilen assoziiert ist⁶. Daten aus einer gepoolten Analyse von sieben großen randomisierten, kontrollierten Studien ergaben, dass ungefähr fünf Patienten innerhalb von 90 Minuten nach Beginn der Symptomatik mit Alteplase behandelt werden müssen, um einen behindernden Schlaganfall zu verhindern¹⁹. Bei Beginn der Lyse im Zeitfenster 91-180

Minuten müssen schon neun Patienten, bei Beginn 181-270 Minuten nach Symptombeginn sogar 15 Patienten mit Alteplase behandelt werden, damit ein Patient ein exzellentes Endergebnis nach ischämischem Schlaganfall hat¹⁹.

In Diskrepanz zur klinischen Evidenz einer Zeitabhängigkeit der Effektivität der Lysetherapie und der daraus resultierenden Notwendigkeit, die Lyse ohne Zeitverzug zu initiieren, steht die Realität im klinischen Alltag. In zwei großen multizentrischen Registerstudien, der vorwiegend europäischen ‚Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study‘ (SITS-MOST) und der amerikanischen ‚Get With The Guidelines‘ (GWTG)-Stroke-Studie lagen die medianen Zeitspannen zwischen Beginn der Symptomatik und Therapiebeginn bei 140 bzw. 144 Minuten^{53,54} und damit deutlich außerhalb des effektivsten ersten Drittels des Lysefensters. Trotz intensiver Anstrengungen verschiedener Arbeitsgruppen, insbesondere die intrahospitalen Abläufe so zu optimieren, dass mediane Zeitspannen von der Krankenhausaufnahme bis zum Therapiebeginn von knapp unter 30 Minuten möglich sind, ist es den Gruppen jedoch jeweils aufgrund von Verzögerungen im prähospitalen Bereich nicht gelungen, Zeitspannen von Beginn der Symptomatik bis zum Therapiebeginn von unter 100 Minuten zu erreichen^{52,55,56}.

Ein alternativer und noch relativ neuer Ansatz, mit der es möglich ist, sowohl die prä- als auch die intrahospitalen Verzögerungen zu minimieren, ist der prähospitaler Beginn der Lysetherapie in einer mobilen Schlaganfalleinheit (engl. mobile stroke unit, MSU). Erstmals erwähnt und konzipiert wurde die MSU von Prof. Dr. Klaus Faßbender, Direktor der Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar⁵⁷. Dort wurde im Jahre 2008 auch die erste MSU in Dienst gestellt⁵⁸. An der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurde durch Prof. Dr. Heinrich Audebert das STEMO verwirklicht, das seit 2011 im Einsatz ist⁵⁹.

Das STEMO ist ein Rettungsfahrzeug der Berliner Feuerwehr. Es ist mit einem Computertomographen ausgestattet, mit dem eine zerebrale Computertomographie (CT) und eine CT-Angiographie (CTA) der hirnversorgenden Arterien durchgeführt werden kann. Über eine teleradiologische Verbindung können die CT- und CTA-Bilder an einen Neuroradiologen zur Bildbefundung übermittelt werden. Zusätzlich verfügt das STEMO über Laborgeräte, mit denen patientennahe Labordiagnostik (engl.: point of care testing, POCT) durchgeführt werden kann. Mittels POCT können im STEMO folgende Laborparameter bestimmt werden: international normalized ratio (INR), kleines Blutbild, Blutzucker, Kreatinin und Elektrolyte. Das STEMO ist mit einem Notarzt, der gleichzeitig ein in der Schlaganfallmedizin erfahrener Neurologe ist, einem medizinisch-technischen Radiologieassistenten (MTRA) und einem Rettungsassistenten bzw. Notfallsanitäter besetzt⁶⁰.

Das STEMO wird, gleichzeitig mit einem regulären Rettungswagen der Berliner Feuerwehr, alarmiert, wenn beim Notruf in der Leitstelle der Berliner Feuerwehr der Verdacht auf das Vorliegen eines frischen Schlaganfalls im Lysefenster besteht. In der Leitstelle wurde dazu ein spezifischer Algorithmus zur Schlaganfall-Identifikation entwickelt und validiert⁶¹. Bei Bestätigung der Verdachtsdiagnose nach Eintreffen des STEMO am Einsatzort wird mit dem diensthabenden Neuroradiologen die Indikation für ein Akut-CT besprochen. Anschließend werden vor Ort sofort CT und ggf. CTA durchgeführt und die Bilddaten teleradiologisch an

den Neuroradiologen übermittelt. Parallel dazu erfolgen POCT-Blutanalysen, sowie klinische Evaluation des akuten behindernden neurologischen Defizits, Bestimmung der etablierten Schlaganfallskalen National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) und mRS vor dem Akutereignis und Evaluation von Kontraindikationen einer Lysetherapie. Im Falle der Indikationsstellung einer Lyse wird diese nach ausführlicher Aufklärung des Patienten und/oder der Angehörigen bzw. des gesetzlichen Betreuers direkt am Einsatzort initiiert. Anschließend wird der Patient bei laufender Lysebehandlung im STEMO in die nächstgelegene geeignete Klinik gebracht⁶⁰.

In zwei randomisierten, kontrollierten Studien konnte bislang gezeigt werden, dass die prähospitale Schlaganfallbehandlung mit einer erheblichen Reduktion der Zeitspanne bis zum Beginn der Lysetherapie im Vergleich zur konventionellen Behandlung im Krankenhaus assoziiert ist^{62,63}. In beiden Studien erfolgte eine Randomisierung in Bezug auf die Generierung von Einsatz- bzw. Kontrollwochen. Hierbei war in den Einsatzwochen die MSU bzw. das STEMO verfügbar, in den Kontrollwochen hingegen nicht^{62,63}. In der ersten publizierten Studie aus der Arbeitsgruppe um Klaus Faßbender wurde in einer Gesamtpopulation von 100 Patienten (davon 53 in der MSU-Behandlungsgruppe) die Entscheidung zur Lyse bei den in der MSU behandelten Patienten im Median um 41 Minuten eher als in der Kontrollgruppe getroffen⁶³. Insgesamt erhielten 12 Patienten in der MSU-Gruppe eine Lysetherapie bzw. eine endovaskuläre Thrombektomie⁶³. In der ‚Prehospital Acute Neurological Treatment and Optimization of Medical care in Stroke‘ (PHANTOM-S)-Studie unserer Arbeitsgruppe war die mittlere Zeitspanne vom Alarm bis zum Beginn der Lyse bei Behandlung im STEMO um 25 Minuten kürzer als in den Kontrollwochen⁶². Dabei wurden die Daten von insgesamt 3213 Patienten mit Schlaganfall-Alarm in den STEMO-Wochen (von denen 1804 Patienten im STEMO behandelt worden) mit denen von 2969 Patienten in den Kontrollwochen verglichen⁶². Insgesamt erhielten in den STEMO-Wochen 310 Patienten (davon 200 im STEMO) und 220 Patienten in den Kontrollwochen eine Lysetherapie⁶². Die Unterschiede in den Patientenzahlen zwischen STEMO-Wochen und STEMO-Behandlung sind dadurch bedingt, dass in den STEMO-Wochen nicht alle Patienten mit Schlaganfall-Alarm im STEMO behandelt werden konnten und diese Patienten dann mit einem regulären Rettungswagen ins Krankenhaus gefahren werden mussten⁶². Darüber hinaus konnte in der PHANTOM-S-Studie gezeigt werden, dass die Lyse-Rate und die Anzahl der Patienten, die innerhalb von 90 Minuten nach Beginn der Symptomatik lysiert wurde, in der STEMO-Gruppe deutlich höher war⁶². Auf der anderen Seite war die STEMO-Behandlung weder mit einer erhöhten Rate an Lysekomplikationen noch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert⁶².

Darüber hinaus konnte in einer post-hoc-Analyse der PHANTOM-S-Daten gezeigt werden, dass knapp zehnmal mehr STEMO-Patienten die Lysetherapie innerhalb von 60 Minuten nach Beginn der Symptomatik (sog. „Golden Hour“-Lyse) als Patienten bei konventioneller Behandlung erhielten⁶⁴. Die Wahrscheinlichkeit, nach dem Schlaganfall nach Hause entlassen zu werden, war für Patienten mit „Golden Hour“-Lyse im Vergleich zu Patienten mit späterem Lysebeginn höher⁶⁴. In einer weiteren Analyse der PHANTOM-S-Daten konnte zudem gezeigt werden, dass die STEMO-Behandlung die gezielte Einweisung von Patienten mit zerebrovaskulären Ereignissen in die geeigneten Spezialabteilungen verbessert⁶⁵.

Zusammenfassend konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass das Konzept der prähospitalen Lysebehandlung beim akuten ischämischen Schlaganfall in einer spezialisierten MSU machbar ist und zu einer deutlichen Beschleunigung des Lysebeginns führt. Die MSU-Behandlung ist für die Patienten sicher. Zudem ermöglicht sie eine verbesserte Triage für Patienten mit zerebrovaskulären Ereignissen. Die bislang vorgestellten Daten deuten darüber hinaus an, dass die Behandlung in einer MSU das funktionelle Endergebnis in einem kurzfristigen Beobachtungszeitraum verbessert. Demgegenüber bleibt anhand der bis hierher vorgestellten Studiendaten unklar, ob die prähospitale Lyse in einer MSU auch das Langzeitergebnis nach ischämischem Schlaganfall günstig beeinflusst. Dieser Aspekt ist für die Beurteilung der Effektivität der prähospitalen Schlaganfallbehandlung von entscheidender Bedeutung und wird im Rahmen dieser Arbeit adressiert.

Die Fragestellungen zu dieser Problematik, die im klinischen Teil dieser Arbeit bearbeitet wurden, sind im folgenden Abschnitt formuliert.

1.4 Fragestellungen

In den dieser kumulativen Habilitationsschrift zugrundeliegenden Publikationen wurden verschiedene Forschungsprojekte zum ischämischen Schlaganfall bearbeitet.

Bei den Studien im ersten Teil (Abschnitte 2.1 bis 2.4) handelt es sich um tierexperimentelle Studien an Mäusen. Thematisch sind die vorgestellten Studien auf die Untersuchung von Mechanismen von Präkonditionierung und Toleranz im Gehirn fokussiert. Folgende grundlegende Fragestellungen wurden hierbei bearbeitet:

- Welche Rolle spielt NO im frühen und im verzögerten Zeitfenster von Toleranz im Gehirn?
- Welche Isoenzyme und welche zellulären Quellen sind für die NO-Synthese bei früher und verzögerter Toleranz relevant?
- Welche NO-abhängigen Signalkaskaden sind für die Entwicklung früher und verzögerter Toleranz im Gehirn relevant?

Im Zentrum der Studien des zweiten Teils dieser Arbeit (Abschnitte 2.5 und 2.6) standen klinische Untersuchungen zum Konzept der prähospitalen Lysetherapie beim ischämischen Schlaganfall im STEMO. Hierbei ging es um die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Ist der frühere Beginn der systemischen Lysetherapie im STEMO mit einer Verbesserung des funktionellen Langzeitergebnisses der Patienten assoziiert?
- Welche Relevanz hat der Beginn der Lysetherapie innerhalb der „Golden Hour“ nach Beginn der Symptomatik auf das funktionelle Langzeitergebnis der Patienten?

2. Eigene Arbeiten

2.1 Von iNOS stammendes NO und von nox2 stammendes Superoxid vermitteln Toleranz gegenüber exzitotoxischer Hirnschädigung durch Bildung von Peroxinitrit

Kawano T, Kunz A*, Abe T, Girouard H, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite. J Cereb Blood Flow Metab. 2007; 27: 1453-1462. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600449. (* equal contribution)*

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass iNOS für die Induktion von verzögerter IT in einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie essentiell ist⁴⁷. Ziel dieser Studie an Mäusen war, die Mechanismen dieser iNOS-abhängigen verzögerten Toleranz zu identifizieren. Zur Präkonditionierung wurden zwei etablierte Stimuli, transiente globale Ischämie durch kurzzeitiges Verschließen beider Aa. carotides communes (engl.: bilateral common carotid artery occlusion, BCCAO)⁴⁷ und subkutane Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) verwendet. Für die Studie wurde als Schadensmodell die neokortikale Mikroinjektion von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) zur Induktion einer fokalen kortikalen exzitotoxischen Läsion verwendet. Exzitotoxizität ist ein bedeutender pathophysiologischer Mechanismus, der nach zerebraler Ischämie zur Vergrößerung der ischämie-induzierten Hirnschädigung führt³⁸. Die Größe der exzitotoxischen Läsionen wurde volumetrisch an histologischen Hirnschnitten evaluiert.

Es wurde zunächst nachgewiesen, dass sowohl BCCAO als auch LPS-Injektion eine verzögerte Toleranz gegenüber der durch NMDA induzierten Hirnläsion hervorrufen. Als nächstes wurde gezeigt, dass LPS-Injektion zu einer Induktion der iNOS-Expression führt. Für den präkonditionierenden Stimulus BCCAO wurde die Induktion der iNOS bereits in einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen⁴⁷. Daraufhin zeigten wir, dass BCCAO- oder LPS-Präkonditionierungen tatsächlich iNOS-abhängig sind. Dies gelang durch den Nachweis, dass nach pharmakologischer Inhibition der iNOS durch Aminoguanidin (AG) bzw. in iNOS-Nullmäusen (iNOS -/-) keine Toleranz induziert werden konnte. Die exogene Zufuhr von NO wiederum war in der Lage, die Toleranz in mit AG behandelten Mäusen bzw. in iNOS-Nullmäusen wiederherzustellen. Im Gegensatz dazu gelang es unter iNOS-Inhibition mit AG nicht, die so aufgehobene LPS-induzierte Toleranz durch die Behandlung mit dem zellpermeablen cGMP-Analogen 8-Bromo-cGMP wiederherzustellen. Somit ist iNOS-abhängiges NO zwar für die durch LPS induzierte Toleranz gegenüber exzitotoxischen Läsionen notwendig, der NO-abhängige Effekt wird jedoch nicht durch die Guanylylzyklase und cGMP vermittelt. Daraufhin untersuchten wir die Hypothese, dass diese NO-abhängige Toleranz durch Peroxinitrit, dem Produkt der Reaktion von NO mit Superoxid-Ionen ($O_2^{\cdot-}$) vermittelt wird. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass LPS zu einer erhöhten 3-Nitrotyrosin (3-NT)-Immunreaktivität v.a. in kortikalen Neuronen führt. 3-NT ist ein etablierter Peroxinitrit-Marker. Demgegenüber war die LPS-induzierte 3-NT-Immunreaktivität in iNOS-Nullmäusen sowie in Mäusen, denen die Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase 2 (nox2)-Untereinheit des Superoxid-Ionen produzierenden Enzyms NADPH-Oxidase fehlte,

reduziert. Zudem konnte LPS in nox2-Nullmäusen keine Toleranz induzieren. Somit ist die NADPH-Oxidase an den Mechanismen der LPS-induzierten Toleranz beteiligt. Schließlich konnten wir zeigen, dass eine katalytische Zersetzung von Peroxinitrit die LPS-induzierte Toleranz gegenüber NMDA blockierte.

Zusammenfassend konnten wir damit unsere vermutete Hypothese bestätigen, dass die Toleranz gegenüber NMDA-Exzitotoxizität im Gehirn durch Peroxinitrit, Produkt der Reaktion von iNOS-abhängigem NO mit NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxid-Ionen, vermittelt wird⁴⁰.

<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600449>

2.2 Neurovaskuläre Protektion durch ischämische Toleranz: die Rolle von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoff-Spezies

Kunz A*, Park L*, Abe T, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. *Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. J Neurosci. 2007; 27: 7083-7093. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1645-07.2007. (* equal contribution)*

In der unter 2.1 beschriebenen Studie wurden Mechanismen der verzögerten Toleranz gegenüber lokaler Exzitotoxizität im Hirnparenchym untersucht. Wie bereits erwähnt, ist die Exzitotoxizität ein bedeutender pathophysiologischer Teilaspekt einer komplexen Kaskade von Ereignissen, die nach zerebraler Ischämie dazu führen, dass die ischämiebedingte Hirnschädigung im zeitlichen Verlauf größer wird. Um die Auswirkungen von Präkonditionierung auf die postischämischen Pathomechanismen in ihrer Gesamtheit zu untersuchen, wurde in dieser Studie als Schadensmodell die transiente fokale zerebrale Ischämie in Mäusen (Fadenmodell) verwendet. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung dieses Modells, Auswirkungen von Präkonditionierung auf den CBF und auf die zerebrovaskuläre Regulation (engl.: cerebrovascular regulation, CVR) zu untersuchen. Präkonditionierender Stimulus war die bereits in der Vorstudie angewandte Injektion von LPS. Analog zur Vorstudie wurde die Größe der ischämischen Läsion volumetrisch an histologischen Hirnschnitten bestimmt.

LPS-Präkonditionierung führte zu einer deutlichen Reduktion des Infarktvolumens. Diese LPS-induzierte IT war mit einer Verbesserung des intraintrischämisch gemessenen lokalen CBF in ischämischen Hirnregionen, die durch LPS vor einer Infarzierung bewahrt wurden, assoziiert. Nach pharmakologischer Inhibition der iNOS durch AG bzw. in iNOS-Nullmäusen waren die protektiven Effekte von LPS auf das Infarktvolumen und den verbesserten intraintrischämischen CBF nicht nachweisbar. In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass die postischämisch reduzierten kortikalen CVR nach LPS-Präkonditionierung erhalten waren. Nach pharmakologischer iNOS-Inhibition durch AG bzw. in iNOS-Nullmäusen waren diese LPS-induzierten erhaltenen postischämischen CVR aufgehoben. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass es nach Induktion von IT durch LPS zu einem Anstieg von Sauerstoff-Radikalen in Neuronen und Endothelzellen kam und, dass diese Sauerstoff-Radikale von der NADPH-Oxidase generiert wurden. Um den Einfluss von NADPH-Oxidase-assoziierten Sauerstoff-Radikalen auf die LPS-Induzierte IT zu untersuchen, wurden Nullmäuse, denen die nox2-Untereinheit der NADPH-Oxidase fehlt, untersucht. LPS-Präkonditionierung in nox2-Nullmäusen führte zu keiner Reduktion des Infarktvolumens. Ebenso waren in nox2-Nullmäusen der intraintrischämisch gemessene CBF und die postischämischen CVR nach LPS-Behandlung im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen nicht verbessert. Die bisherigen Ergebnisse zeigten somit die wichtige Bedeutung von NO aus der iNOS und von Sauerstoff-Radikalen aus der NADPH-Oxidase bei der LPS-induzierten IT. Aufgrund der hohen Affinität von NO mit Sauerstoff-Radikalen unter Bildung von Peroxynitrit untersuchten wir als nächstes die Rolle von Peroxynitrit bei der LPS-induzierten IT. Wir konnten mit Hilfe der 3-NT-Immunhistochemie zeigen, dass LPS die 3-NT-Immunreaktivitäten in Neuronen und Endothelzellen erhöhte. Diese erhöhten 3-NT-Immunreaktivitäten waren in iNOS- bzw. nox2-Nullmäusen nicht nachweisbar. Schließlich konnten wir zeigen, dass eine katalytische

Zersetzung von Peroxinitrit die LPS-induzierten 3-NT-Immunreaktivitäten verminderte, sowie die protektiven Effekte von LPS auf das Infarktvolumen, den intranschämischen CBF und die postischämischen CVR blockierte.

Zusammenfassend bekräftigen diese Befunde zum einen die protektive Rolle von Peroxinitrit, einer eigentlich zytotoxisch wirksamen reaktiven Stickstoff- bzw. Sauerstoffverbindung, im Rahmen der LPS-induzierten IT in Mäusen. Auf der anderen Seite deuten die Befunde dieser Studie an, dass neben neuroprotektiven auch vasoprotektive Mechanismen bei der LPS-induzierten IT relevant sind⁴¹.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1645-07.2007>

2.3 Lipopolysaccharid induziert frühe Toleranz gegenüber Exzitotoxizität durch Stickstoffmonoxid und cGMP

Orio M, Kunz A, Kawano T, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Lipopolysaccharide induces early tolerance to excitotoxicity via nitric oxide and cGMP. *Stroke*. 2007; 38: 2812-2817. DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.486837

Während in den unter 2.1 und 2.2 beschriebenen Studien Mechanismen der IT im verzögerten Zeitfenster analysiert wurden, wurde in dieser Studie das bis dato im Gehirn wesentlich weniger untersuchte frühe Zeitfenster der IT untersucht. Ziel dieser Studie war es einerseits zu untersuchen, ob, analog zur verzögerten Toleranz, mit Hilfe von LPS als präkonditionierendem Stimulus auch frühe Toleranz induziert werden kann. Darüber hinaus sollten die Mechanismen der LPS-induzierten frühen Toleranz analysiert werden. Analog zur unter 2.1 beschriebenen Studie wurde hier als Schadenmodell die neokortikale Injektion von NMDA durchgeführt. Die Analyse des Ausmaßes der exzitotoxischen Schädigung erfolgte, wie unter 2.1, histologisch an Hirnschnitten.

In dieser Studie konnte zunächst gezeigt werden, dass LPS-Präkonditionierung, zusätzlich zur bereits etablierten verzögerten Toleranz⁴⁰, auch frühe Toleranz gegenüber exzitotoxischen Läsionen induziert. Darüber hinaus wurde durch Verwendung des Proteinsynthese-Inhibitors Anisomyzin bestätigt, dass diese LPS-induzierte frühe Toleranz trotz gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese nachweisbar ist. Bei der Analyse der Mechanismen der LPS-induzierten frühen Toleranz untersuchten wir, analog zu den unter 2.1 und 2.2. beschriebenen Studien, die Rolle von NO. Wir konnten pharmakologisch mit AG und an iNOS-Nullmäusen zeigen, dass, im Gegensatz zur späten Toleranz, iNOS-abgeleitetes NO keine Rolle bei der LPS-induzierten Früh toleranz spielt. Dieser Befund erklärt sich aus der Tatsache, dass für die Aktivierung der iNOS Enzyminduktion durch *de novo* Proteinsynthese notwendig ist. Als nächstes untersuchten wir die Rolle von nNOS und eNOS, die im Gehirn auch unter Ruhebedingungen NO synthetisieren. Nach pharmakologischer Inhibition der nNOS mit 7-Nitroindazol (7-NI) konnte keine LPS-induzierte frühe Toleranz induziert werden. Analog dazu war frühe Toleranz in nNOS-Nullmäusen nicht nachweisbar. Ebenso konnte auch in eNOS-Nullmäusen keine frühe Toleranz gegenüber NMDA-Läsionen induziert werden. Weiterhin wollten wir den Nachweis führen, dass tatsächlich NO eine kritische Rolle bei der LPS-induzierten frühen Toleranz spielt. Dazu substituierten wir bei bestehender nNOS-Inhibition durch 7-NI bzw. in nNOS-Nullmäusen NO durch Gabe eines NO-Donors und konnten damit frühe Toleranz wiederherstellen. Schließlich untersuchten wir die Hypothese, dass NO durch den second messenger cGMP frühe Toleranz vermittelt. Inhibition der löslichen Guanylylzyklase durch 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) führte zur kompletten Inhibition von LPS-induzierter früher Toleranz. Diese konnte wiederum durch zusätzliche Applikation eines cGMP-Analogons wiederhergestellt werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass LPS frühe Toleranz gegenüber kortikalen NMDA-Läsionen induziert. Diese LPS-induzierte frühe Toleranz wird durch nNOS- und eNOS-abhängiges NO und eine cGMP-abhängige Signalkaskade vermittelt⁴².

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.486837>

2.4 Bilateraler Verschluss der A. carotis communis ist ein adäquater präkonditionierender Stimulus zur Induktion früher ischämischer Toleranz gegenüber fokaler zerebraler Ischämie

Speetzen LJ, Endres M, Kunz A. Bilateral common carotid artery occlusion as an adequate preconditioning stimulus to induce early ischemic tolerance to focal cerebral ischemia. J Vis Exp. 2013; (75): e4387. DOI: 10.3791/4387.

In der unter 2.3 beschriebenen Studie haben wir den Nachweis geführt, dass in einem Mausmodell frühe Toleranz gegenüber neokortikalen exzitotoxischen Läsionen induziert werden kann und dass dabei NO, synthetisiert von den konstitutionell vorhandenen Enzymen nNOS und eNOS, eine kritische Rolle spielen. Da bis dato sehr wenig über die Mechanismen der frühen IT im Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie (Fadenmodell) bekannt war, haben wir in dieser Studie eine Methode zur Untersuchung von IT im frühen Zeitfenster beschrieben. Als präkonditionierenden Stimulus haben wir die, bereits für verzögerte IT etablierte, kurzzeitige globale Ischämie (BCCAO) verwendet. Unser Ischämiemodell war das Fadenmodell der transienten fokalen zerebralen Ischämie. Wir konnten zeigen, dass drei Episoden von jeweils 60 Sekunden BCCAO, gefolgt von einer fünfminütigen Reperfusion, nicht zu verzögertem Zelltod 72 Stunden nach BCCAO im Sinne einer Apoptose führt. Darüber hinaus konnten wir im Rahmen dieser Methodenbeschreibung zeigen, dass 30 Minuten nach BCCAO eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens nachweisbar ist. Diese BCCAO-induzierte Neuroprotektion ist nur transient vorhanden und bei Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie eine Stunde nach BCCAO nicht mehr nachweisbar. Im Einklang zu den Literaturberichten, kommt es mit zeitlicher Latenz nach Präkonditionierung erneut zu einer ischämietoleranten Phase, die in der aktuellen Studie bereits zwei Stunden nach BCCAO und 24 Stunden nach BCCAO noch deutlicher nachweisbar ist.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie ein Modell zur frühen IT gegenüber transienter fokaler zerebraler Ischämie etablieren, bei dem der präkonditionierende Stimulus eine transiente globale Ischämie ist⁴³.

<https://doi.org/10.3791/4387>

2.5 Funktionelle Folgen von prähospitaler Thrombolyse in einem Schlaganfallmobil im Vergleich zur konventionellen Versorgung: eine Beobachtungs- und Register-Studie

Kunz A, Ebinger M, Geisler F, Rozanski M, Waldschmidt C, Weber JE, Wendt M, Winter B, Zieschang K, Fiebach JB, Villringer K, Erdur H, Scheitz JF, Tütüncü S, Bollweg K, Grittner U, Kaczmarek S, Endres M, Nolte CH*, Audebert HJ*. *Functional outcomes of pre-hospital thrombolysis in a mobile stroke treatment unit compared with conventional care: an observational registry study. Lancet Neurol.* 2016; 15: 1035-1043. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30129-6. (* equal contribution)

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass die prähospitale Lysetherapie an Bord des STEMO früher als die entsprechende Behandlung im Krankenhaus initiiert werden kann⁶². Allerdings wurde in der Studie nicht untersucht, ob der frühere Beginn der Lyse mit einer Verbesserung der Langzeitfolgen des ischämischen Schlaganfalls assoziiert ist.

In dieser Beobachtungsstudie wurde das funktionelle Ergebnis drei Monate nach ischämischem Schlaganfall und systemischer Lyse von zwei prospektiven Registern verglichen: (1) ein prähospitales Register mit Behandlung und systemischer Lyse im STEMO und (2) ein in-hospitales Register mit Behandlung im regulären Rettungswagen und systemischer Lyse in einem Krankenhaus (Charité, Campus Benjamin Franklin). Primärer Endpunkt dieser Studie war der Anteil an Patienten, die vor dem Akutereignis unabhängig zu Hause gelebt haben und drei Monate nach dem Schlaganfall ohne relevante Behinderung waren (entsprechend eines mRS ≤ 1). Sekundäre Endpunkte waren der Anteil an Patienten ohne schwere Behinderung nach drei Monaten (entsprechend eines mRS ≤ 3), die Mortalität nach drei Monaten und die ordinale Analyse über den gesamten Bereich der mRS-Skala. Als Sicherheitsendpunkte wurden lysebedingte intrakranielle Blutungen und die Mortalität innerhalb von sieben Tagen analysiert. Zwischen Februar 2011 und März 2015 wurden insgesamt 1218 Patienten mit ischämischem Schlaganfall und systemischer Lyse in beide Register eingeschlossen, von denen 932 Patienten die Einschlusskriterien erfüllten. Die primäre Studienpopulation, d.h. alle Patienten, die vor dem Akutereignis unabhängig zu Hause lebten, umfasste 305 Patienten im Prähospital- und 353 Patienten im Intrahospital-Register. Die mittlere Zeitspanne von Beginn der Symptomatik bis zum Beginn der Lyse war in der Prähospital-Kohorte um 33 Minuten kürzer als in der konventionellen Behandlungsgruppe. Die nicht-adjustierte Analyse ergab einen klaren Trend, dass im Vergleich mit der Intrahospital-Gruppe ein größerer Anteil der Patienten aus der STEMO-Gruppe drei Monate nach ischämischem Schlaganfall und Lyse keine relevante Behinderung hatte. Allerdings verfehlte dieser Unterschied mit $p=0,14$ die statistische Signifikanz. Hingegen waren für beide sekundären Endpunkte die Ergebnisse aus der STEMO-Kohorte signifikant besser. Die ordinale Analyse über den gesamten Bereich der mRS-Skala und die beiden Sicherheitsendpunkte zeigten im Vergleich der beiden Register keinen signifikanten Unterschied. In der adjustierten Analyse zeigte sich für die STEMO-Gruppe im Vergleich zur Intrahospital-Gruppe eine höhere Wahrscheinlichkeit, drei Monate nach dem Schlaganfall ohne Behinderung zu sein, allerdings wurde auch hier die statistische Signifikanz mit einem

$p=0,052$ verfehlt. Ebenso war die Mortalität in der STEMO-Gruppe nach drei Monaten nichtsignifikant geringer. Hingegen war die Wahrscheinlichkeit, drei Monate nach Schlaganfall ohne schwere Behinderung zu überleben, für Patienten aus der STEMO-Gruppe signifikant höher.

Zusammenfassend erbrachte dieser Registervergleich einen klaren, jedoch nicht signifikanten, Trend für ein besseres Langzeitergebnis für Patienten mit ischämischem Schlaganfall, die prähospital im STEMO lysiert wurden. Mit dieser Studie wurden erstmals belastbare Daten publiziert, die unsere Hypothese bestätigen, dass mit einer Verkürzung der Zeitspanne bis zur Lyse durch deren prähospitalen Beginn im STEMO das Langzeitergebnis der Patienten verbessert werden kann⁶⁶.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30129-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30129-6)

2.6 Effekte der ultrafrühen intravenösen Thrombolyse auf die Folgen des ischämischen Schlaganfalls: Die STEMO (Stroke-Einsatzmobil)-Gruppe

Kunz A, Nolte CH, Erdur H, Fiebach JB, Geisler F, Rozanski M, Scheitz JF, Villringer K, Waldschmidt C, Weber JE, Wendt M, Winter B, Zieschang K, Grittner U, Kaczmarek S, Endres M, Ebinger M, Audebert HJ. *Effects of Ultraearly Intravenous Thrombolysis on Outcomes in Ischemic Stroke: The STEMO (Stroke Emergency Mobile) Group. Circulation. 2017; 135: 1765-1767. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027693.*

In der unter 2.5 beschriebenen Studie haben wir in einer Registervergleichsstudie gezeigt, dass eine frühere Lysetherapie beim ischämischen Schlaganfall durch deren prähospitalen Beginn im STEMO mit einem besseren funktionellen Ergebnis nach drei Monaten assoziiert ist⁶⁶. Aus den Daten einer gepoolten Analyse von sieben großen randomisierten, kontrollierten Studien wissen wir, dass das Langzeitergebnis der Patienten nach Lysetherapie dann am besten ist, wenn die Behandlung innerhalb von 90 Minuten nach Beginn der Symptomatik begonnen wird¹⁹. Bei der Analyse der Daten aus großen prospektiven Lyse-Registerstudien wird jedoch deutlich, dass bei Beginn der Behandlung im Krankenhaus nur ein ganz geringer Anteil an Patienten innerhalb von 90 Minuten oder sogar innerhalb von 60 Minuten nach Beginn der Symptomatik (der sogenannten „Golden Hour“) behandelt werden^{53,54}. Daten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe hingegen belegen, dass es uns durch die prähospitale Lyse gelingt, deutlich mehr Patienten innerhalb der „Golden Hour“ zu behandeln⁶⁴.

In dieser Studie haben wir daher die Daten aus den beiden Lyse-Registern (prä- und intrahospitale Lyse), die Grundlage für die unter 2.5 beschriebene Studie waren⁶⁶, gepoolt und die Patienten in drei verschiedene Zeitintervalle nach dem Lysebeginn (0-60 min, 61-120 min und 121-270 min) kategorisiert. Für die Analyse wurden die ersten beiden Zeitintervalle mit dem Zeitintervall 121-270 min verglichen, das als Referenzintervall definiert wurde. Die primäre Studienpopulation war auf Patienten fokussiert, die vor dem Akutereignis unabhängig zu Hause lebten. Primärer Endpunkt der Studie war das Überleben ohne relevante Behinderung ($mRS \leq 1$) drei Monate nach Schlaganfall. Sekundäre Endpunkte waren Überleben ohne schwere Behinderung ($mRS \leq 3$) und Mortalität nach drei Monaten.

Die primäre Studienpopulation bestand aus 625 Patienten. 84% (111/133) der Patienten, die innerhalb der „Golden Hour“ lysiert wurde, wurden im STEMO behandelt. 43% (111/259) der Patienten, die im STEMO lysiert wurden und nur 6% (22/366) der Patienten, die im Krankenhaus therapiert wurden, erhielten die Behandlung innerhalb der ersten 60 Minuten nach Beginn der Symptomatik. In der adjustierten Analyse waren die Wahrscheinlichkeiten für ein Überleben ohne relevante Behinderung (entsprechend $mRS \leq 1$), für ein Überleben ohne schwere Behinderung (entsprechend $mRS \leq 3$) signifikant höher sowie für die Mortalität signifikant geringer, wenn die Lysetherapie innerhalb von 60 Minuten im Vergleich zum Referenzintervall (121-270 min) begann.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass frühere Lysebehandlung, insbesondere der Beginn der Therapie innerhalb der ersten 60 Minuten nach Beginn der Symptomatik, mit einem besseren funktionellen Überleben nach drei Monaten und mit einer

reduzierten Mortalität verbunden ist. Zudem werden mit dieser Studie erstmals Daten zum Langzeit-Outcome bei Patienten mit Lyse innerhalb der „Golden Hour“ vorgelegt. Diese Daten bestätigen die vermutete Hypothese, dass die „Golden Hour“-Lyse mit einem besseren funktionellen Überleben nach drei Monaten assoziiert ist⁶⁷.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027693>

3. Diskussion

In den in dieser Arbeit vorgestellten Projekten wurden zum einen tierexperimentelle Studien zur Toleranz bzw. IT im Gehirn, zum anderen klinische Studien zur prähospitalen Behandlung des ischämischen Schlaganfalls im STEMO bearbeitet. Aufgrund der inhaltlich unterschiedlichen Themenfelder werden die beiden Schwerpunkte dieser Arbeit zunächst getrennt diskutiert und dann in einer gemeinsamen Zusammenfassung integriert.

3.1 Toleranz im Gehirn

Der Erkenntnisgewinn auf dem Gebiet der Toleranz bzw. IT im Gehirn im Ergebnis von knapp drei Jahrzehnten intensiver Forschung zu diesem Thema ist immens. In der Diskussion der Ergebnisse meiner Studien werde ich mich nach einer kurzen Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse auf die Rolle der NO-abhängigen Signalkaskade im Rahmen von Toleranz bzw. IT sowie auf die translational-klinischen Implikationen fokussieren.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien zur Toleranz bzw. IT im Gehirn haben zusammengefasst folgende neue Erkenntnisse erbracht:

- Für die zerebrale Toleranz im frühen Zeitfenster ist NO ein essentieller Faktor. Hierbei sind die konstitutiv im Gehirn exprimierten Enzyme nNOS und eNOS relevant. Die NO-abhängige Signalkaskade wird unter anderem durch cGMP vermittelt⁴².
- Zerebrale Toleranz bzw. IT im verzögerten Zeitfenster wird durch Peroxynitrit, Produkt der Reaktion von iNOS-abhängigen NO und NADPH-Oxidase-abhängigen Superoxid-Ionen, vermittelt. Bei LPS-induzierter IT sind neben neuro- auch vasoprotektive Mechanismen relevant^{40,41}.
- In einer weiteren thematisch verwandten Studie wurde ein *in vivo* Maus-Modell zur Untersuchung der frühen zerebralen IT mit transienter globaler Ischämie als präkonditionierendem Stimulus beschrieben⁴³.

Im Zentrum der Untersuchungen zur Toleranz bzw. IT im Gehirn standen also die Rolle des Moleküls NO und die dabei ablaufenden, durch NO vermittelten, Mechanismen. Wie bereits einleitend berichtet, ist die kritische Rolle von NO bei Toleranz bzw. IT im Gehirn bereits vor Veröffentlichung der in dieser Arbeit vorgestellten Studien etabliert gewesen. Dies betrifft sowohl frühes als auch verzögertes Zeitfenster von zerebraler Toleranz bzw. IT.

3.1.1 Frühe Toleranz

Für das frühe Zeitfenster der zerebralen IT existierte bis dahin nur eine Publikation, in der die Rolle von NO untersucht wurde. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass frühe IT, ausgelöst durch kurzzeitige fokale zerebrale Ischämie, zwar in Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in nNOS oder eNOS-Nullmäusen, induziert werden kann⁴⁹. Die Ergebnisse der von unserer Arbeitsgruppe publizierten Studie stehen im Einklang zu den Daten von Atochin und Kollegen. Während in der Studie von Atochin et al. eine fokale zerebrale Ischämie, sowohl als präkonditionierender Trigger als auch als Induktor des ischämischen Zellschadens,

verwendet wurde, wurde in unserer Studie LPS zur Induktion von Kreuztoleranz appliziert. Der letale Zellschaden in unserer Studie wurde durch akute Exzitotoxizität, induziert durch direkte kortikale Injektion von NMDA, ausgelöst⁴². Exzitotoxische Mechanismen sind entscheidend an der Ausbreitung des ischämischen Zellschadens im Bereich der Penumbra beteiligt⁵¹. Die Rolle von eNOS und nNOS bei früher Toleranz bzw. IT im Gehirn konnte also in zwei unabhängigen Publikationen und unter Verwendung unterschiedlicher methodischer Ansätze gezeigt werden^{42,49}. Die Beteiligung von nNOS und eNOS bei der Induktion von Toleranz im frühen Zeitfenster ist unter Berücksichtigung von Expression und Aktivierung beider NOS-Isoenzyme nicht überraschend. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass es sich bei den NOS-Isoenzymen nNOS und eNOS um konstitutiv exprimierte Enzyme handelt. Das bedeutet, dass beide Isoenzyme unter Ruhebedingungen im Gehirn enzymatisch aktiv sind. Beide Enzyme werden durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und erhöhen somit die Freisetzung von NO⁶⁸. Diese Mechanismen der nNOS- bzw. eNOS-abhängigen NO-Synthese sind kompatibel zum Konzept der frühen Toleranz bzw. IT. Wie in der Einleitung beschrieben, entwickelt sich frühe Toleranz innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden nach Einwirkung des präkonditionierenden Stimulus und basiert mechanistisch auf posttranslationalen Modifikationen, nicht auf *de novo*-Proteinsynthese^{26,32}.

In der Studie unserer Arbeitsgruppe konnten wir zusätzlich noch den vermutlichen Beginn der NO-abhängigen Signalkaskade bei früher zerebraler Toleranz identifizieren: cGMP. Über den weiterführenden Signalweg kann derzeit nur spekuliert werden, da er für die Vorgänge bei früher IT im Gehirn noch nicht entschlüsselt wurde. In diesem Fall lohnt es, sich den Stand der Forschung bei der frühen IT am Herzen zu vergegenwärtigen. Im Gegensatz zum Gehirn sind die Mechanismen der IT am Herzen wesentlich besser verstanden, da das Herz in diesem Feld das am meisten untersuchte Organ ist⁶⁹. So sind die NO- und cGMP-abhängigen Abläufe bei IT im Herzen in eine komplexe Signalkaskade integriert, bei der es durch die Bildung von cGMP zur Aktivierung der Proteinkinase G kommt. Die Proteinkinase G vermittelt über unterschiedliche Mechanismen die Aktivierung von in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten ATP-abhängigen Kaliumkanälen ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$). Durch den resultierenden Einstrom von K^+ in die mitochondriale Matrix kommt es über mehrere Zwischenschritte letztendlich zur Hemmung der Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP). Diese Hemmung der mPTP-Öffnung ist mit erhöhter Resistenz der Mitochondrien gegenüber Schädigung infolge von Ischämie und Reperfusion assoziiert⁷⁰. Ob im Gehirn bei früher IT dieselbe Signalkaskade relevant ist, ist aktuell unklar. Es konnte jedoch beispielsweise die neuroprotektive Wirkung einer Öffnung von $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ -Kanälen demonstriert werden^{26,71,72}.

Der Grund, warum offensichtlich beide NOS-Isoenzyme, nNOS und eNOS für frühe Toleranz bzw. IT im Gehirn notwendig sind, ist aktuell unklar. Es könnte jedoch, insbesondere vor dem Hintergrund der Studie aus unserer Arbeitsgruppe, vermutet werden, dass beide Isoenzyme nacheinander aktiviert werden⁴². So ist aus Studien an Endothelzellkulturen bekannt, dass LPS die eNOS im Endothel aktiviert⁷³. Das daraufhin aus dem Endothel freigesetzte NO diffundiert in das umliegende Hirnparenchym und führt dort zur zusätzlichen Aktivierung der

nNOS⁴². Der Ablauf dieser Signalkaskade bei früher Toleranz bzw. IT im Gehirn ist jedoch ungeklärt und erfordert einen experimentellen Nachweis⁴².

Zusammenfassend verdichten sich die Hinweise, dass NO eine kritische Rolle bei Toleranz im frühen Zeitfenster spielt. Hierbei wird NO von der nNOS und der eNOS – beides konstitutiv im Gehirn exprimierte NOS-Isoenzyme – bereitgestellt. Die NO-abhängige Signalkaskade beinhaltet vermutlich cGMP und die Aktivierung von mitoK_{ATP}.

3.1.2 Späte Toleranz

Eine kritische Rolle von NO bei Toleranz bzw. IT im Gehirn ist für das verzögerte Zeitfenster wesentlich besser etabliert als für das frühe Zeitfenster. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass die der verzögerten IT im Gehirn zugrundeliegenden Mechanismen wesentlich besser untersucht sind als die der frühen IT. Aufgrund der vergleichsweise robusteren Neuroprotektion und zugleich der bestehenden zeitlichen Latenz von mehreren Stunden von der Präkonditionierung bis zur Entwicklung von zerebraler Toleranz bzw. IT erscheint das späte Zeitfenster für klinische Anwendungen geeigneter als das frühe Zeitfenster.

Vor Veröffentlichung der in dieser Arbeit beschriebenen Studien haben Puisieux et al. in einer Studie an Ratten nachweisen können, dass der protektive Effekt einer durch LPS induzierten Präkonditionierung durch Vorbehandlung mit L-N^G-Nitroarginin-Methyl-Ester (L-NAME), einem unselektiven NOS-Inhibitor, nicht nachweisbar war. Die Autoren schlussfolgern, dass NO bei LPS-abhängiger Toleranz eine wichtige Rolle spielt⁷⁴. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen zwei weitere Studien an Ratten, in denen jeweils unterschiedliche präkonditionierende Stimuli und letale Ischämien angewandt wurden^{75,76}. Die Quelle der NO-Synthese wurde in diesen drei Studien jedoch nicht untersucht. Weitere Studien haben die Rolle der drei NOS-Isoenzyme bei später IT detaillierter untersucht. Gidday et al. haben dazu an einem Modell der hypoxischen Präkonditionierung an neugeborenen Ratten zeigen können, dass die durch hypoxische Präkonditionierung induzierte Protektion durch Vorbehandlung mit einem unselektiven NOS-Inhibitor blockiert werden konnte. Die Neuroprotektion war jedoch nach Vorbehandlung mit einem nNOS- oder einem iNOS-Inhibitor nicht blockiert. Die Autoren der Studie schlussfolgerten nach dem Ausschlussprinzip, dass die eNOS in diesem Modell eine kritische Rolle spielt⁷⁷. Dies wurde in einer anderen Studie an neugeborenen Ratten unter Verwendung einer unterschiedlichen Methodik bestätigt⁷⁸. Dagegen konnte eine weitere Arbeitsgruppe in mehreren Studien an neugeborenen Ratten nachweisen, dass späte IT von der induzierbaren NOS-Isoform (iNOS) abhängig ist⁷⁹⁻⁸¹.

Zusätzlich zu den erwähnten Studien an neugeborenen Ratten finden sich einige Untersuchungen an adulten Tieren, die die Rolle der NOS-Isoenzyme bei später zerebraler Toleranz analysiert haben. In der überwiegenden Mehrzahl dieser Studien konnte nachgewiesen werden, dass das NO, das bei später Toleranz im Gehirn relevant ist, von der iNOS synthetisiert wird²⁶. Kapinya et al. untersuchten die präkonditionierende Wirkung von Inhalationsanästhetika an einem Ischämie-Modell durch Verschluss der A. cerebri media (engl. middle cerebral artery occlusion, MCAO) in Ratten. Sie fanden, dass die durch

Anästhetika induzierte IT durch Induktion von iNOS vermittelt war. Inhibition der iNOS durch AG blockierte die protektive Wirkung der Anästhetika in diesem Modell⁴⁸. In einer weiteren Studie an Ratten mit Verwendung des Inhalationsanästhetikums Isofluran als präkonditionierendem Stimulus konnte u.a. gezeigt werden, dass 24 Stunden nach Isofluran-Präkonditionierung der regionale CBF im ischämischen Kortex (nach MCAO) erhöht war und, dass diese regionale CBF-Zunahme iNOS-abhängig war⁸². Die iNOS-Abhängigkeit von später zerebraler IT konnte zudem nach pharmakologischer Präkonditionierung im Rattenmodell nachgewiesen werden⁸³.

Die Abhängigkeit von IT im späten Zeitfenster von der iNOS konnte darüber hinaus an mehreren Studien an Mäusen bestätigt werden. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurden zwei unterschiedliche präkonditionierende Stimuli (transiente globale Ischämie bzw. LPS) verwendet und jeweils die kritische Rolle der iNOS gezeigt. Mechanistisch wurde eine iNOS-abhängige erhöhte mitochondriale Resistenz gegenüber kalzium-vermittelter Depolarisation vermutet⁴⁷. Auch andere Arbeitsgruppen konnten im Mausmodell die iNOS-Abhängigkeit später zerebraler IT zeigen⁸⁴.

Im Gegensatz zu den bislang erwähnten Studien an adulten Tieren, in denen anhand unterschiedlicher Tiermodelle sowie unterschiedlicher präkonditionierender Stimuli bzw. Ischämie Modelle jeweils eine kritische Rolle von iNOS bei der späten zerebralen Toleranz gezeigt werden konnte, wurde in zwei Studien vermutet, dass die eNOS hierfür essentiell ist^{85,86}. So wurde z.B. in der einen Studie an Mäusen wurde gezeigt, dass hypoxische Präkonditionierung 24 Stunden vor einer experimentellen Subarachnoidalblutung (SAB) nahezu komplett SAB-induzierte Vasospasmen und neurologische Defizite verhinderte. Diese protektiven Effekte waren nach NOS-Inhibition und in eNOS-Nullmäusen nicht mehr nachweisbar⁸⁶. In dieser Studie wurde gezielt der Einfluss der Präkonditionierung auf die eNOS-Expression und -Aktivität untersucht, da die eNOS im Zusammenhang mit Vasospasmen nach SAB eine wichtige Rolle spielt⁸⁷.

Die Daten der beiden in dieser Arbeit beschriebenen Studien haben, wie eingangs bereits zusammengefasst, folgende grundlegende Erkenntnisse erbracht:

- Späte IT im Gehirn beinhaltet neben, das Hirnparenchym betreffenden, neuroprotektiven, auch direkt vasoprotektive Mechanismen. Dies umfasst eine durch LPS-Präkonditionierung induzierte Verbesserung des CBF in Hirnregionen, die durch LPS-Präkonditionierung vor Infarzierung bewahrt wurden, sowie eine Verbesserung der postischämischen zerebrovaskulären Dysregulation⁴¹.
- Toleranz bzw. IT im späten Zeitfenster ist iNOS-abhängig. Dabei wird die Protektion durch Peroxinitrit, Produkt der Reaktion von iNOS-abhängigem NO und NADPH-oxidase-abhängigem Superoxid vermittelt^{40,41}.

Unsere experimentellen Hinweise, dass späte IT neben direkten neuroprotektiven Mechanismen (z.B. genetische und mitochondriale Adaptationen³⁸) auch vasoprotektive Aspekte umfasst, wird durch Daten anderer Arbeitsgruppen unterstützt²⁶. So konnte gezeigt werden, dass LPS die postischämische (4 oder 24 Stunden nach MCAO) mikrovaskuläre Perfusion in Hirnregionen, die durch die Präkonditionierung vor Infarzierung bewahrt wurden, erhalten konnte⁸⁸. In einer Studie, in der IT durch kurzzeitige fokale Ischämie 72

Stunden vor letaler fokaler Ischämie induziert wurde, konnte mit Hilfe von Laser-Dopplerflusssmessung (engl. laser doppler flowmetry, LDF) sowie mit „arterial spin labeling“- und Perfusions-Magnetresonanztomographie (MRT)-Messungen gezeigt werden, dass ischämische Präkonditionierung bereits während der letalen Ischämie zu einer Verbesserung des regionalen CBF führt⁸⁹. Eine weitere Studie verwendete sowohl quantitative ($[^{14}\text{C}]$ -Jodantipyrin-Autoradiographie) als auch relative (LDF) CBF-Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ischämie in einem IT-Modell (Präkonditionierung: fokale Ischämie, letale Ischämie: permanente fokale Ischämie) an Ratten. In dieser Studie wurde in der Gruppe der präkonditionierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ab drei Stunden nach permanenter MCAO eine Erholung des CBF im ischämischen Kortex gemessen. Die Autoren dieser Studie kommen zu dem Schluss, dass die frühzeitige Reperfusion in der Penumbra die primäre Determinante der durch IT induzierten Protektion ist⁹⁰. Einer weiteren Studie kommt mit anderer Methodik zu ähnlichen Ergebnissen⁹¹.

Zusammenfassend bestätigen die experimentellen Daten der einen in dieser Arbeit beschriebenen Studie⁴¹, dass die Induktion von später IT im Gehirn bereits während der zerebralen Ischämie, aber auch in der sich unmittelbar anschließenden postischämischen Phase zur Verbesserung der bestehenden zerebrovaskulären Dysfunktion führt. Diese durch Präkonditionierung induzierte verbesserte Vasoregulation ist sicherlich ein relevanter Mechanismus der durch IT induzierten Protektion. Nach zerebraler Ischämie sind wichtige Regulationen der zerebralen Zirkulation, wie z.B. die Fähigkeit von Neuronen oder Endothelzellen, den CBF zu erhöhen, stark beeinträchtigt^{26,28}. Diese ischämiebedingte zerebrovaskuläre Dysfunktion beeinträchtigt möglicherweise zusätzlich die Rekrutierung von Perfusion aus normal perfundierten Kollateralgefäßen^{26,28}. Die Verbesserung der ischämiebedingten zerebrovaskulären Dysfunktion nach Präkonditionierung – spezifisch in Parenchymabschnitten, die nach LPS-Präkonditionierung vor ischämischer Schädigung bewahrt wurden – könnte wiederum dazu beitragen, dass die Rekrutierung kollateraler Perfusion in diesen Arealen während der Ischämie verbessert wird und somit weniger Hirngewebe dieser Penumbra kritisch minderperfundiert wird^{28,41}. Dadurch wird weniger Hirngewebe ischämisch geschädigt. Diese vermuteten Vorgänge sind jedoch hypothetisch und erfordern eine experimentelle Bestätigung.

Zusätzlich zum Einfluss von IT auf die zerebrovaskuläre Regulation konnte in den Studien in zwei verschiedenen *in vivo*-Modellen Peroxinitrit als nächstes Glied in der Signalkaskade der iNOS-abhängigen Toleranz bzw. IT identifiziert werden^{40,41}. Dieser Befund erscheint auf den ersten Blick etwas überraschend. Peroxinitrit gehört zu den potenten Stickstoff-Radikalen und ist das Produkt der Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen. Peroxinitrit hat eine relativ lange biologische Halbwertszeit und ist hochreagibel. Die schädigenden biologischen Wirkungen von Peroxinitrit sind mannigfaltig, die Wichtigsten davon sind nachfolgend exemplarisch erwähnt. Es ist u.a. in der Lage, Lipide, Proteine und Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid, DNA) oxidativ und nitrosativ zu schädigen und wirkt auf diese Weise neurotoxisch. Darüber hinaus führt Peroxinitrit durch Reduktion des myogenen Tonus der arteriellen Gefäße, durch verminderte Bioverfügbarkeit von NO und durch Inhibition der Prostazyklin-Synthese zur zerebrovaskulären Dysfunktion. Weitere schädigende Mechanismen von Peroxinitrit umfassen die Inhibition des mitochondrialen Isoenzyms der

Superoxiddismutase, die Induktion von DNA-Strangbrüchen und nachfolgenden Mangel an Energiesubstraten durch Aktivierung des DNA-Reparaturenzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), sowie die Oxidation von Tetrahydrobiopterin und die dadurch resultierende Entkopplung der NO-Synthase^{28,92,93}.

Auf der anderen Seite sind für Peroxinitrit eine Reihe protektiver Eigenschaften beschrieben worden. So aktiviert Peroxinitrit die protektiven zellulären Signalkaskaden Akt und MAP (engl.: mitogen-activated protein)-Kinase, induziert Vasodilatation und inhibiert die Leukozytenadhäsion^{41,94-98}. Darüber hinaus wurde Peroxinitrit eine Rolle als präkonditionierende Verbindung in einem IT-Modell am Myokard zugeschrieben⁹⁹.

Zusammengefasst sind für Peroxinitrit sowohl schädigende als auch protektive Eigenschaften beschrieben worden. Dabei ist ungeklärt, welche zusätzlichen Faktoren bzw. Mechanismen relevant sind, damit Peroxinitrit entweder protektiv bzw. toxisch wirksam ist. Möglicherweise ist die Höhe der einwirkenden Peroxinitrit-Konzentrationen hierbei wichtig, wobei Peroxinitrit in niedrigen Konzentrationen (möglicherweise im nanomolaren Bereich) eher protektiv wirkt, während es in höheren Konzentrationen (möglicherweise im mikromolaren Bereich) mehr toxische Wirkungen hat^{41,100}. So ist denkbar, dass Peroxinitrit im Rahmen der Induktion von zerebraler Toleranz bzw. IT in niedriger Konzentration gebildet wird und dann die erwähnten protektiven Wirkungen hat. Unter pathophysiologischen Bedingungen hingegen, beispielsweise im Rahmen einer ischämischen Hirnschädigung, wird Peroxinitrit in höheren Konzentrationen freigesetzt und wirkt dann neurotoxisch.

Trotz der experimentellen Hinweise, dass Peroxinitrit eine wichtige protektive Rolle im Rahmen zerebraler Toleranz und IT spielt, erscheint es wahrscheinlich, dass zusätzliche Peroxinitrit-unabhängige Mechanismen in diesem Zusammenhang relevant sind. Die Tatsache, dass nach katalytischer Zersetzung von Peroxinitrit durch Fe(III)5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato chloride (FeTPPS) die protektiven Wirkungen von LPS bezüglich des Infarkt Volumens und der zerebrovaskulären Reaktivitäten nicht vollständig aufgehoben waren⁴¹, unterstützen diese Vermutung. Neben verschiedenen, in unseren Experimenten nicht untersuchten Abläufen, könnten NO-abhängige Mechanismen, die nicht zur Bildung von Peroxinitrit führen, eine Rolle spielen. Auf die pleiotropen protektiven Wirkungen von NO wurde bereits in der Einleitung kurz hingewiesen. Im Zusammenhang mit zerebraler Toleranz und IT könnte hierbei auch die NO-abhängige Aktivierung protektiver Programme, wie beispielsweise die Induktion von CREB (engl.: cAMP response element-binding protein)-abhängigen Genen durch S-Nitrosylierungen relevant sein^{26,101}.

3.1.3 Translationale Aspekte

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien haben, zusammen mit weiteren Publikationen, gezeigt, dass NO eine wichtige Rolle bei den Mechanismen von Toleranz bzw. IT im Gehirn spielt. Nun stellt sich als nächstes die Frage, in wieweit diese Erkenntnisse Implikationen für zukünftige klinische Anwendungen haben könnten.

Für die Beantwortung dieser Frage ist es zunächst hilfreich, sich analoge Mechanismen bei IT im Herzen anzuschauen. Es ist wichtig festzustellen, dass trotz möglicher paralleler

pathophysiologischer Abläufe Unterschiede bei Induktion und Aufrechterhaltung von zerebraler gegenüber kardialer IT bestehen³⁶. Darüber hinaus wurden die Mechanismen von IT am Herzen sehr intensiv untersucht. Dies hängt damit zusammen, dass das menschliche Herz sowohl *ex vivo* als auch *in situ* im Zuge unterschiedlicher Eingriffe, wie beispielsweise Koronarangiographie oder Bypass-Operation, präkonditioniert werden kann³⁶.

NO spielt auch bei IT am Herzen eine prominente Rolle, und zwar sowohl als Induktor als auch als Mediator der toleranzassoziierten Kardioprotektion³⁶. So ist am Herzen bereits seit langem etabliert, dass eNOS-abhängiges NO am Herzen sowohl akute als auch verzögerte IT induziert³⁶. Dabei erscheint es irrelevant, ob das präkonditionierende NO aus endogener Quelle (eNOS) kommt oder exogen substituiert wird. Es finden sich in der Literatur zahlreiche sowohl präklinische als auch klinische Studien, die gezeigt haben, dass die Applikation von NO-Donatoren, wie beispielsweise organische Nitrate, Nitrite oder verschiedene andere Verbindungen im Herzen IT induzieren und auf diese Weise kardioprotektiv wirken¹⁰².

In Studien am Herzen konnte also bereits demonstriert werden, dass NO eine wichtige Rolle bei den Mechanismen der IT spielt. Zudem wurde speziell auch gezeigt, dass NO bzw. NO-freisetzende Verbindungen in der Lage sind, IT zu triggern. Die nachgewiesenen mechanistischen Überlappungen bei NO-abhängiger Toleranz am Herzen und im Gehirn lässt die Vermutung zu, dass NO auch bei zerebraler Toleranz bzw. IT eine Triggerfunktion übernehmen könnte. Diese Hypothese kann durch eigene experimentelle Befunde am NMDA-Läsionsmodell bekräftigt werden. Wir haben beispielsweise gezeigt, dass die Applikation des NO-Donators Dipropylenetriamine NONOate (DPTA NONOate) vier Stunden nach LPS-Gabe den durch vorherige iNOS-Inhibition mit AG aufgehobenen präkonditionierenden LPS-Effekt wiederherstellte⁴⁰. Darüber hinaus gelang mit DPTA NONOate die Wiederherstellung der LPS-induzierten Toleranz in iNOS-Nullmäusen⁴⁰. Allerdings kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass die vorherige LPS-Behandlung eine relevante Rolle bei der durch NO getriggerten Toleranz spielt. Zudem ist unklar, ob diese Zusammenhänge auch im Tiermodell der fokalen zerebralen Ischämie relevant sind²⁶. Für die Planung von zukünftigen experimentellen Studien zur Beantwortung dieser Fragestellungen müssen zudem weitere potentielle Schwierigkeiten im Zusammenhang mit der Applikation von NO bzw. NO-Donatoren als Induktoren zerebraler IT beachtet werden. So müssen bekannte Nebenwirkungen von NO bzw. NO-Donatoren berücksichtigt werden, wie z.B. die dosisabhängige Hypotension oder die Entwicklung einer Nitrattoleranz bei Verwendung von organischen Nitraten^{26,102}. Eine weitere Herausforderung ist sicherzustellen, dass NO in ausreichender Konzentration dem Zielgewebe zur Verfügung gestellt werden kann²⁶. Bekanntermaßen ist NO als reaktives Gas im Gewebe frei diffusibel und hat gleichzeitig eine nur sehr kurze Halbwertszeit. Dies macht die Bereitstellung einer definierten stabilen NO-Konzentration im Hirngewebe sehr schwierig. Zusammenfassend sind weitere experimentelle Vorarbeiten erforderlich, um abzuschätzen, ob NO als Induktor von IT für einen perspektivischen klinischen Einsatz in Frage käme.

Bislang wurden im Wesentlichen mechanistische Aspekte der Rolle von NO bei zerebraler Toleranz bzw. IT erörtert. Für eine Translation dieser Zusammenhänge in mögliche

zukünftige klinische Anwendungen sind noch einige grundlegende Fragestellungen zu klären, auf die ich im Folgenden überblicksartig eingehen möchte.

Zunächst muss die Frage geklärt werden, ob das Phänomen der zerebralen IT beim Menschen ein klinisches Korrelat hat. Die Sequenz einer kurzzeitigen „subletalen“ zerebralen Ischämie im zeitlichen Zusammenhang mit einer nachfolgenden „letalen“ Ischämie ist ein realistisches Szenario bei Patienten, die vor einem Hirninfarkt eine oder mehrere transitorische ischämische Attacken (TIA) gehabt haben. Tatsächlich finden sich mehrere Studien, die die Hypothese eines präkonditionierenden Effekts von TIA im zeitlichen Zusammenhang vor einer zerebralen Ischämie unterstützen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit TIA vor dem ischämischen Hirninfarkt ein besseres klinisches Outcome hatten als Patienten ohne vorherige TIA¹⁰³. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die mithilfe des MRT gemessenen Infarktvolumina trotz vergleichbarer Perfusionsdefizite bei Patienten mit vorheriger TIA kleiner waren als bei Patienten ohne vorherige TIA¹⁰⁴. In weiteren Studien wurde ebenfalls die Vermutung geäußert, dass ischämische Schlaganfälle bei Patienten mit vorheriger TIA weniger schwerwiegend verlaufen als bei Patienten ohne TIA^{105,106}. Im Gegensatz dazu finden sich allerdings auch einzelne Studien, die einen Zusammenhang zwischen geringerer Schwere des ischämischen Schlaganfalls und Auftreten vorangehender TIA nicht nachweisen konnten^{107,108}. Über die Gründe, warum diese Studien negativ waren, kann nur spekuliert werden. Möglicherweise spielt der Einschluss von Patienten mit längerer TIA-Dauer in der Studie von Johnston¹⁰⁸ bzw. das höhere Lebensalter der Patienten in der Studie von Della Morte et al.¹⁰⁷ eine Rolle¹⁰⁹. Darüber hinaus war bei lakunären ischämischen Hirninfarkten im Gegensatz zu nicht-lakunären Infarkten ein präkonditionierender Effekt durch vorherige TIAs nicht nachweisbar¹¹⁰.

In der Zusammenschau der verfügbaren Daten kann also vermutet werden, dass das Phänomen der zerebralen IT auch beim Menschen existiert und dass TIA im zeitlichen Zusammenhang vor einem ischämischen Hirninfarkt adäquate präkonditionierende Stimuli sind. Hierzu konträre Studien sind möglicherweise durch relevante methodische Unterschiede begründet.

Eine zweite wichtige Frage betrifft die Auswahl eines geeigneten klinischen Modells zur Induktion von zerebraler IT. Der klassische Weg der Induktion von zerebraler IT, eine kurzzeitige „subletale“ zerebrale Ischämie, ist für klinische Anwendungen ungeeignet. Hier besteht durch das präkonditionierende Manöver eine erhebliche Gefahr, dass der Patient einen ischämischen Schlaganfall erleidet. In den vergangenen Jahren wurden alternative Ansätze zur klassischen Präkonditionierung entwickelt und getestet, die für klinische Anwendungen geeigneter sind. Einen geeigneten Ansatz möchte ich an dieser Stelle skizzieren: die sogenannte entfernte ischämische Präkonditionierung (engl.: remote ischemic preconditioning, RIPC). Bei der RIPC führt die Präkonditionierung eines Organs bzw. eines Körperteils zur Induktion von IT in einem anderen (entfernten) Organ. Ein typischer Ansatz für RIPC ist die Präkonditionierung einer Extremität durch eine Serie von transienten Unterbrechungen des Blutflusses in der betreffenden Extremität. Die Effektivität der Induktion von zerebraler IT durch RIPC konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden¹¹¹. Die Anwendung von RIPC zur Induktion von IT im Gehirn ist vor allem deswegen attraktiv,

weil eine potentiell gefährliche Manipulation direkt an den zerebralen Gefäßen entfällt. Die genauen Mechanismen, wie IT durch RIPC induziert wird, sind noch nicht detailliert untersucht. Es scheinen jedoch sowohl neuronale als auch humorale Faktoren eine Rolle zu spielen. Dabei finden sich auch mehrere Studien, die NO eine wichtige Rolle bei RIPC zuschreiben¹¹¹⁻¹¹³.

Abschließend müssen noch geeignete klinische Szenarien erwähnt werden, bei denen es denkbar ist, dass durch Induktion zerebraler IT das klinische Outcome verbessert wird. Im Allgemeinen kommen hierfür Erkrankungen in Frage, bei denen das Risiko für eine zeitnahe zerebrale Ischämie im Vergleich zu einer Vergleichskohorte signifikant erhöht ist. Dies trifft beispielsweise für Patienten mit asymptomatischen hochgradigen (>80%) Karotisstenosen zu, bei denen das Risiko eines ischämischen Schlaganfalls mit 2-5% pro Jahr angegeben wird¹¹⁴. Auch bei Patienten mit hochgradigen (50-99%) Stenosen der intrakraniellen Arterien ist das Risiko für einen ischämischen Schlaganfall erhöht. In dieser Patientengruppe besteht bei asymptomatischen Stenosen ein Risiko für einen ischämischen Schlaganfall von 3,5% pro Jahr, bei symptomatischen Stenosen beträgt es sogar 12-14% in den ersten beiden Jahren nach dem Erstereignis¹¹⁵. Ein deutlich höheres Risiko für einen akuten ischämischen Schlaganfall haben auch Patienten nach kürzlich erlittener SAB. Das Risiko für das Auftreten einer verzögerten zerebralen Ischämie nach SAB lag in verschiedenen Studien, je nach zugrundeliegender zerebraler Bildgebung, zwischen 35 und 81%¹¹⁶⁻¹¹⁸. Darüber hinaus besteht bei Patienten, die sich elektiven operativen oder interventionellen Eingriffen an den hirnversorgenden Arterien unterziehen müssen, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten ischämischer Schlaganfälle. Beispiele für derartige Eingriffe sind die Thrombendarteriektomie (TEA) bei hochgradiger Karotisstenose oder das endovaskuläre Coiling von intrazerebralen Aneurysmen. So kam eine Meta-Analyse zu dem Ergebnis, dass in 12% der Karotis-TEA postoperativ neue diffusionsgewichtete (engl.: diffusion-weighted imaging, DWI) Läsionen im zerebralen MRT gefunden wurden¹¹⁹. In einer prospektiven Studie wurde die Häufigkeit des Auftretens neuer DWI-Läsionen im Anschluss an das endovaskuläre Coiling rupturierter oder nicht-rupturierter intrazerebraler Aneurysmen untersucht und in 17/43 (40%) der Interventionen neue DWI-Läsionen festgestellt¹²⁰. In der Zusammenschau resultieren für alle erwähnten Erkrankungen und Eingriffe signifikant erhöhte Risiken für das Auftreten ischämischer Schlaganfälle. Klinische Studien zur Machbarkeit, Sicherheit und Effektivität der Induktion von IT könnten daher gezielt Patienten mit diesen Entitäten untersuchen.

Eine Recherche in der Internet-Datenbank www.clinicaltrials.gov am 26.07.2018 unter Verwendung der Suchstrings „preconditioning“, „stroke“, „ischemic stroke“ und „brain“ ergab, dass es sechs aktiv rekrutierende (NCT03027011, NCT02808754, NCT02553655, NCT02411266, NCT02381522 und NCT02169739) und weitere sechs abgeschlossene (NCT01691911, NCT01654666, NCT01570231, NCT01321749, NCT01158508 und NCT01110239) klinische Studien zum Thema zerebrale IT gibt. In allen zwölf Studien wird als präkonditionierender Stimulus RIPC verwendet. In diese unterschiedlichen Studien wurden bzw. werden unter anderem Patienten nach SAB, Patienten vor Karotis-TEA, Patienten vor Karotis-Stenting, sowie Patienten mit symptomatischen intrakraniellen Stenosen rekrutiert. Eine dieser Studien lieferte bereits vielversprechende Ergebnisse. Es handelt sich um eine

randomisierte kontrollierte „Proof-of-Concept“-Studie, in die Patienten mit hochgradiger ($\geq 70\%$) Karotisstenose in einen von drei Behandlungsarmen (RIPC, Sham, Kontrolle) randomisiert wurden. Ein primärer Endpunkt der Studie, die Inzidenz neuer postinterventioneller DWI-Läsionen innerhalb von 48 h nach Stenteinbringung in die A. carotis, war im RIPC-Behandlungsarm signifikant niedriger als in den Kontroll- und Sham-Armen¹²¹.

Zusammenfassend liefern die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien wichtige neue Erkenntnisse zur Rolle von NO und zu den NO-abhängigen Mechanismen bei der zerebralen IT. Weiterführende Literaturdaten deuten an, dass zerebrale IT auch im klinischen Setting genutzt werden könnte. Präferentiell bietet sich hierbei das Modell der RIPC an. Die Ausnutzung der zerebralen IT für spezifische klinische Entitäten wird aktuell in zunehmendem Maße evaluiert. Hierbei sind bereits erste vielversprechende Daten verfügbar.

3.2 Prähospitaler Schlaganfallbehandlung mit dem STEMO

Das Konzept einer prähospitalen Behandlung von Patienten mit akutem Schlaganfall an Bord einer mit CT und Minilabor ausgestatteten MSU ist mit seiner Erstbeschreibung im Jahre 2003 vergleichsweise neu⁵⁷. In den vergangenen Jahren wurden in zunehmendem Maße Studien publiziert, die u.a. gezeigt haben, dass durch die Verlagerung der Lysebehandlung in den Prähospital-Bereich eine eindrucksvolle Verkürzung der Zeitspanne vom Beginn der Symptomatik bis zum Therapiebeginn erreicht werden kann^{62,63}. Das daraus resultierende Potential einer infolge des deutlich früheren Therapiebeginns denkbaren relevanten Prognoseverbesserung für Patienten mit akutem Schlaganfall hat zu einer rasanten globalen Zunahme an aktiven MSU geführt⁵².

3.2.1 Einfluss der prähospitalen Behandlung des ischämischen Schlaganfalls auf das funktionelle Langzeitergebnis

Ziel der in dieser Arbeit zu diesem Thema vorgestellten beiden Studien (siehe Kapitel 2.5 und 2.6) war zu untersuchen, ob die in den Machbarkeitsstudien nachgewiesene Zeitverkürzung bis zum Behandlungsbeginn bei prähospitaler Lyse mit einer Verbesserung des funktionellen Endergebnisses nach ischämischem Schlaganfall assoziiert ist.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der beiden Studien noch einmal dargestellt.

In einer Vergleichsstudie zweier Lyse-Kohorten, einer prähospitalen und einer intrahospitalen, wurde der Einfluss der prähospitalen Lyse auf das funktionelle Ergebnis nach drei Monaten untersucht und erbrachte zusammengefasst folgende Resultate:

- Die prähospitaler Lyse im STEMO führte für Patienten, die vor dem Akutereignis ohne Unterstützung zu Hause lebten, im Trend zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Leben ohne Behinderung drei Monate nach dem akuten ischämischen Schlaganfall als bei Beginn der Lyse im Krankenhaus. Darüber hinaus waren nach Lyse im STEMO die Wahrscheinlichkeiten für ein Überleben ohne schwere Behinderung signifikant größer und die Mortalitäten signifikant geringer als in der im Krankenhaus lysierten Kohorte. Die Sicherheitsendpunkte erbrachten keine Unterschiede zwischen der prä- und der intrahospitalen Kohorte⁶⁶.

In der zweiten Studie wurden die Daten der beiden erwähnten Lyse-Register gepoolt und hinsichtlich der Relevanz des Lysebeginns innerhalb von 60 Minuten nach Symptombeginn auf das funktionelle Ergebnis nach drei Monaten analysiert. Diese Studie kam zu folgenden Ergebnissen:

- In dieser gepoolten Analyse aller prä- und intrahospital lysierten Patienten der beiden Kohorten, die vor dem Akutereignis ohne Unterstützung zu Hause lebten, zeigte sich nach Kategorisierung der Patienten entsprechend der Symptombeginn-bis-Lyse-Zeiten, dass Patienten mit Lyse innerhalb von 60 Minuten nach Symptombeginn eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Überleben ohne Behinderung, eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Überleben ohne schwere Behinderung sowie eine geringere

Mortalität drei Monate nach ischämischem Schlaganfall hatten als Patienten, die erst im Zeitfenster 121-270 Minuten nach Symptombeginn lysiert wurden⁶⁷.

In der ersten Studie, der Vergleichsstudie beider Lyse-Register, ergab die Analyse der Zeiten vom Beginn der Akutsymptomatik bis zum Lysebeginn jeder Kohorte, dass die im STEMO behandelten Patienten durchschnittlich 30 Minuten früher als die im Krankenhaus behandelten Patienten lysiert wurden⁶⁶. Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt, wissen wir aus gepoolten bzw. Metanalysen von großen randomisierten, kontrollierten Lysestudien, dass es in Bezug auf die Effektivität der Lysetherapie eine klare Zeitabhängigkeit gibt^{6,19}.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Studie ist, dass es mit dem prähospitalen Beginn der Lysetherapie im STEMO möglich ist, signifikant mehr Patienten innerhalb der ersten 60 Minuten nach Beginn der Symptome zu behandeln. Aufgrund der bekannten pathophysiologischen Abläufe beim ischämischen Schlaganfall mit progredientem irreversiblen Untergang von Hirngewebe bei prolongierter zerebraler Ischämie wird bei einem Lysebeginn innerhalb der ersten 60 Minuten des Schlaganfalls, in Anlehnung an das grundlegende Konzept des Trauma-Management auch als „Golden Hour“ bezeichnet, ein prognostisch günstiger Verlauf angenommen. In der Registervergleichsstudie wurden 112/305 Patienten (37%) der STEMO-Kohorte und 14/353 Patienten (4%) der Intrahospital-Kohorte innerhalb der „Golden Hour“ lysiert. Dieser deutliche Unterschied in den Raten der „Golden Hour“-Lysen zwischen prä- und intrahospitalen Gruppen wurde auch in den beiden randomisierten, kontrollierten MSU-Machbarkeitsstudien beschrieben^{62,63}. Auch in den ersten publizierten Fallserien kürzlich etablierter MSUs wird ein relevanter Anteil an „Golden Hour“-Lysen berichtet¹²²⁻¹²⁴. Im Gegensatz dazu lagen die Raten an „Golden Hour“-Lysen in den Lyse-Registern Safe Implementation of Treatments in Stroke – International Stroke Thrombolysis Registry (SITS-ISTR) lediglich bei 1,4%¹²⁵ bzw. GWTG-Stroke bei 1,3%^{126,127}.

Diese mittlerweile recht robuste Datenlage macht es sehr wahrscheinlich, dass die in unserer Registervergleichsstudie in der STEMO-Kohorte nachgewiesene Zeitersparnis kausal mit dem nachweisbaren klaren Trend zu einem verbesserten funktionellen Ergebnis nach drei Monaten assoziiert ist⁶⁶. Die Aussagekraft unserer Studiendaten ist allerdings insofern eingeschränkt, als dass die Unterschiede in Bezug auf den primären Endpunkt, der Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Behinderung nach drei Monaten, zwischen beiden Kohorten das notwendige Signifikanzlevel verfehlten. Die Analyse der sekundären Endpunkte, Überlebenswahrscheinlichkeit ohne schwere Behinderung und Mortalität, erbrachte jedoch jeweils signifikante Vorteile für die STEMO-Kohorte⁶⁶.

Die Studie war mit Publikation im Jahre 2016 weltweit die erste, die zeigen konnte, dass der prähospitaler Beginn der Lysebehandlung in einer MSU im Vergleich zum Lysebeginn im Krankenhaus im Trend mit einer Verbesserung des funktionellen Ergebnisses drei Monate nach Akutereignis assoziiert ist⁶⁶. In einer zuvor publizierten posthoc-Analyse von Daten aus der PHANTOM-S-Studie konnte bis dato lediglich gezeigt werden, dass Patienten mit „Golden Hour“-Lyse im Vergleich zu Patienten mit späterem Lysebeginn eine höhere Wahrscheinlichkeit hatten, nach dem Krankenhausaufenthalt nach Hause entlassen zu werden^{64,66}. Mittlerweile gibt es weitere Daten, die die Hinweise aus unserer ersten Studie

für den prognostischen Vorteil einer prähospitalen Schlaganfallbehandlung in einer MSU unterstützen. In erster Linie ist hierbei die ebenfalls in dieser Arbeit beschriebene gepoolte Analyse aus Daten unserer prä- und intrahospitalen Lyse-Register zum funktionellen Ergebnis von Patienten nach „Golden Hour“-Lyse anzuführen⁶⁷. Diese ist gleichzeitig die erste Studie, in der gezeigt werden konnte, dass Patienten mit „Golden Hour“-Lyse ein besseres funktionelles Ergebnis nach drei Monaten haben. Die Ergebnisse stehen damit auch im Einklang mit der in gepoolten Analysen, Registerstudien und einer posthoc-Analyse der PHANTOM-S-Studie vermuteten Hypothese, dass ein früherer Beginn der Lysetherapie mit einem besseren funktionellen Ergebnis assoziiert ist^{6,19,64,67,126}. Zusammen mit dem deutlichen Anstieg an „Golden Hour“-Lysen im Falle des Vorhandenseins einer MSU und damit der Option für eine prähospitaler Lyse – in der gepoolten Analyse wurden 111/133 (84%) der „Golden Hour“-Lysen im STEMO durchgeführt – findet sich damit ein weiterer Hinweis dafür, dass das MSU-Konzept durch die frühere Lysetherapie zu einer Verbesserung des Langzeitergebnisses nach ischämischem Schlaganfall führt⁶⁷.

Eine kürzlich publizierte Analyse hat zudem das funktionelle 3-Monatsergebnis von Patienten mit „Golden Hour“-Lyse im STEMO mit dem von Patienten verglichen, die innerhalb von 60 Minuten nach Symptombeginn im Krankenhaus lysiert wurden¹²⁸. Diese Daten wurden dem Safe Implementation of Treatments in Stroke – East (SITS-EAST)¹²⁹ Register entnommen. Rationale für diese Analyse war zu untersuchen, ob der Ort der Lyse (prä- vs. intrahospital) das Langzeitergebnis beeinflusst. In der Analyse fanden sich keinerlei Unterschiede in Bezug auf das funktionelle Langzeitergebnis zwischen beiden Kohorten. Auch die Sicherheitsendpunkte zeigten keine Unterschiede. Somit ist es in Bezug auf das funktionelle Langzeitergebnis von Patienten mit „Golden Hour“-Lyse irrelevant, ob die Lyse an Bord einer MSU oder im Krankenhaus durchgeführt wird¹²⁸. Diese Untersuchung bekräftigt das Streben nach Verkürzung der Zeiten bis zum Beginn der Lyse, idealerweise mit Lysebeginn innerhalb der „Golden Hour“. Diese „Golden Hour“-Lysen sind, wie bereits diskutiert, in relevantem Umfang nur an Bord einer MSU möglich. Hierbei gibt es offensichtlich gegenüber einer vergleichbaren „Golden Hour“-Lyse im Krankenhaus keine Bedenken in Bezug auf Effektivität oder Sicherheit¹²⁸.

In einer weiteren separaten retrospektiven Analyse von Daten unserer beiden Kohorten (prä- und intrahospital) wurde das funktionelle 3-Monatsergebnis von Patienten mit bereits vor dem akuten ischämischen Schlaganfall bestehenden funktionellen Behinderungen untersucht¹³⁰. In dieser Analyse war der Beginn der Lysetherapie bei prähospitaler Behandlung durchschnittlich 27 Minuten früher als bei Behandlung im Krankenhaus¹³⁰. In der adjustierten Analyse zeigte sich für die im STEMO lysierte Kohorte eine höhere Wahrscheinlichkeit für ein Überleben ohne schwere Behinderung nach drei Monaten¹³⁰. Somit ergeben sich auch für Patienten mit bereits vor dem Akutereignis bestehender Behinderung und Abhängigkeit Hinweise für ein verbessertes funktionelles Ergebnis nach drei Monaten, wenn die Lysetherapie bereits prähospital in einer MSU initiiert wird¹³⁰.

Die Hinweise für ein verbessertes funktionelles Ergebnis drei Monate nach prähospitaler Lyse im STEMO, wie in der Vergleichsstudie der prä- und intrahospitalen Register⁶⁶ gezeigt, können auf der anderen Seite nicht dadurch erklärt werden, dass die Lyse-Daten der

intrahospitalen Vergleichskohorte deutlich schlechter waren als vergleichbare Daten aus bekannten Lyseregistern. In unserem intrahospitalen Register begann die Lyse im Median 112 Minuten nach Beginn der Symptomatik und damit sogar früher als in den SITS-MOST- (Median: 140 Minuten) bzw. GWTG-Stroke-Registern (Median: 144 Minuten)^{53,54,66}.

Eine Analyse der funktionellen 3-Monatsergebnisse von Patienten beider Kohorten, die zusätzlich zur Lysetherapie interventionell thrombektomiert wurden, erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Die Aussagekraft dieser Daten ist jedoch erheblich eingeschränkt, da in beiden Kohorten für heutige Verhältnisse vergleichsweise wenige interventionelle Behandlungen erfolgten. Hierbei ist zu beachten, dass das Ende der Rekrutierung für diese Studie mit der Veröffentlichung der erfolgreichen Thrombektomiestudien im Jahre 2015 zusammenfällt²¹⁻²⁵. Unsere Studie war somit zu dem Zeitpunkt, als die flächendeckende Verwendung der modernen Stent-Retriever einsetzte, beendet. Zudem könnte die vergleichsweise geringere Zahl von Thrombektomien in der STEMO-Kohorte ein Indiz für eine frühzeitige Rekanalisierung des Gefäßverschlusses nach prähospitalen Lysebeginn sein⁶⁶. Es wird erwartet, dass die aktuell durchgeführte Berlin Prehospital Or Usual Delivery of acute stroke care (B_PROUD)-Studie, eine Folgestudie der hier diskutierten Registervergleichsstudie, detaillierte Antworten zum Einfluss der prähospitalen Behandlung von Thrombektomie-Kandidaten im STEMO auf das funktionelle Ergebnis nach drei Monaten geben wird¹³¹.

Für die Interpretation der Ergebnisse der beiden besprochenen Studien müssen eine Reihe von Limitationen beachtet werden, von denen die relevantesten nachfolgend diskutiert werden. Zunächst ist als potentieller systematischer Fehler anzusehen, dass die Patienten der STEMO-Kohorte zwar alle akut im STEMO behandelt wurden, die nachfolgende stationäre Behandlung jedoch in Stroke Units verschiedener Krankenhäuser erfolgte. Umgekehrt wurden die Patienten der Intrahospital-Kohorte alle in der Stroke Unit eines Krankenhauses (Charité – Campus Benjamin Franklin, C-CBF) behandelt. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Behandlung auf der Stroke Unit des C-CBF per se mit einem schlechteren funktionellen Ergebnis nach drei Monaten assoziiert ist, zumal der mittlere sozioökonomische Status der Patienten im Einzugsgebiet des C-CBF innerhalb Berlins am höchsten ist. Dennoch wurde dieser mögliche Einfluss der stationären Behandlung am C-CBF in einer posthoc-Analyse adressiert, in der die Krankenhauszuweisung (C-CBF vs. andere) in die multiple Regressionsanalyse aufgenommen wurde. Die erneute Analyse unter Berücksichtigung dieser Variable änderte nichts an den Ergebnissen, es zeigten sich in der STEMO-Kohorte nach drei Monaten weiterhin signifikante Vorteile in Bezug auf ein Überleben ohne Behinderung bzw. auf ein Überleben ohne schwere Behinderung⁶⁶.

Ein weiterer potentieller systematischer Fehler liegt in der Erhebung der funktionellen 3-Monatsergebnisse anhand des mRS. Es waren zwar alle Auswerter für die Erhebung des mRS zertifiziert, allerdings gab es für jede Kohorte ein separates Auswerte-Team, da beide Kohorten von unterschiedlichen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen gepflegt wurden. Zudem erfolgte keine verblindete mRS-Erhebung, so dass insbesondere in der STEMO-Kohorte eine Verzerrung denkbar ist, da die mRS-Auswerter auch direkt an der STEMO-Versorgung

beteiligt waren. Dieser systematische Fehler trifft auf beide im Rahmen dieser Arbeit diskutierten eigenen Studien zu^{66,67}.

Die Beurteilung der Schwere der Schlaganfallsymptomatik erfolgte in der STEMO-Kohorte zu einem vergleichsweise früheren Zeitpunkt als in der Intrahospital-Kohorte. Es ist denkbar, dass sich, dem individuellen Verlauf der Schlaganfallsymptomatik folgend, die Symptome zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme, also dem Erhebungszeitpunkt für die Intrahospital-Kohorte, zum Besseren aber auch zum Schlechteren verändert hätten. Hieraus ergibt sich ein weiterer potentieller systematischer Fehler^{66,67}.

Darüber hinaus ist noch zu beachten, dass aufgrund der methodischen Verwendung eines Vergleichs zweier Register nicht alle Basisparameter gleichverteilt waren und dass nicht beobachtete und nicht dokumentierte Störfaktoren nicht in die adjustierten Analysen einbezogen werden konnten und somit zusätzliche Verzerrungen der Ergebnisse möglich sein könnten^{66,67}.

Schließlich sollte noch erwähnt werden, dass die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse die Verhältnisse, wie sie in der Metropole Berlin existieren, widerspiegeln. Der Nachweis eines generellen Vorteils der prähospitalen Schlaganfallbehandlung an Bord einer MSU in Bezug auf das funktionelle 3-Monatsergebnis, der dann auch für den ländlichen Raum zu zeigen wäre, steht aktuell noch aus^{66,67}.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Studie darauf hin, dass die prähospitalen Lysetherapie in einer MSU mit einem verbesserten funktionellem Ergebnis nach drei Monaten assoziiert ist, auch wenn in Bezug auf den primären Endpunkt, ein Überleben nach drei Monaten ohne Behinderung, das Signifikanzlevel verfehlt wurde. Darüber hinaus zeigt sich insbesondere ein Vorteil in Bezug auf das funktionelle Langzeitergebnis für Patienten, die innerhalb der „Golden Hour“, also weniger als 60 Minuten nach dokumentiertem Beginn der Schlaganfallsymptomatik, lysiert wurden. Die Ergebnisse dieser Studien stehen im Einklang mit den Daten aus randomisierten, kontrollierten Lysestudien, nach denen eine Korrelation zwischen früherem Lysebeginn und besserem funktionellen Langzeitüberleben besteht^{66,67}.

Im Hinblick auf zahlreiche relevante Limitationen beider Studien sind weitere Daten präferentiell aus multizentrischen, randomisierten und kontrollierten Studien notwendig, um die in diesen Studien erstmals gezeigten Hinweise für einen Langzeitvorteil der prähospitalen Schlaganfallbehandlung in einer MSU zweifelsfrei zu bestätigen.

3.2.2 Aktuelle Entwicklungen und Perspektiven der prähospitalen Schlaganfallbehandlung an Bord einer MSU

Seit der Erstbeschreibung der MSU⁵⁷ wird das Konzept der prähospitalen Behandlung von Schlaganfallpatienten zunehmend wissenschaftlich evaluiert. Wie bereits erwähnt stammen die derzeit robustesten Daten aus zwei randomisierten, kontrollierten Studien, die gezeigt haben, dass mit der Behandlung von Patienten mit ischämischem Schlaganfall in der MSU die Lysetherapie deutlich früher beginnen kann und dass das MSU-Konzept für die Patienten sicher ist^{62,63}. Darüber hinaus gibt es erste Hinweise, unter anderem aus zwei eigenen in

dieser Arbeit diskutierten Studien, dass die MSU-Behandlung auch mit einem besseren funktionellen Langzeitergebnis assoziiert ist^{64,66,67}.

Diese vielversprechenden Daten zur prähospitalen Schlaganfallbehandlung haben in den vergangenen Jahren zur weltweiten Etablierung neuer MSU geführt. Im Mai 2014 wurde in Houston (Texas) die erste MSU in den USA in Dienst gestellt¹³². Nach einer achtwöchigen Pilotphase, in der zwölf Patienten lysiert wurden, davon vier innerhalb von 60 Minuten nach Symptombeginn¹²⁴, wurde dort im August 2014 die Benefits of Stroke Treatment Delivered Using a Mobile Stroke Unit (BEST-MSU)-Studie, eine multizentrische, prospektive, cluster-randomisierte Studie gestartet, in der das funktionelle Ergebnis nach 90 Tagen und die Kosteneffektivität des Konzepts evaluiert wird¹³³. Mit einer Publikation der BEST-MSU-Ergebnisse ist nicht vor 2020 zu rechnen¹³³. Darüber hinaus evaluierte die Arbeitsgruppe aus Houston telemedizinische Ansätze für die Akuttherapie beim Schlaganfall und konnten zeigen, dass die telemedizinische Beurteilung von Schlaganfallpatienten zuverlässig, präzise, sowie ohne Zeitverluste für die Entscheidungsfindung der Akuttherapie möglich ist^{134,135}.

Im Juli 2014 wurde in Cleveland (Ohio) eine weitere, primär telemedizinisch basierte, MSU in den USA in Dienst gestellt^{123,136}. Abweichend von den bislang beschriebenen MSU-Konzepten, ist hier von Anbeginn kein im Schlaganfall-Bereich erfahrener Neurologe an Bord. Anstelle dessen, erfolgt die klinische Beurteilung durch eine examinierte Pflegekraft („Registered Nurse“) vor Ort, supervidiert durch einen telemedizinisch anwesenden Neurologen^{123,136}. Es konnte gezeigt werden, dass dieses telemedizinisch basierte MSU-Konzept machbar ist und die Zeiten bis zum Beginn der Lyse im Vergleich zur konventionellen Behandlung signifikant reduziert werden können^{123,136}. Zudem konnten 25% der MSU-basiert lysierten Patienten innerhalb der „Golden Hour“ behandelt werden¹²³. Die Arbeitsgruppe aus Cleveland konnte zudem zeigen, dass auch Patienten mit der Indikation für eine Thrombektomie durch die Behandlung in der MSU besser triagiert und damit schneller interventionell behandelt werden¹³⁷.

In Oslo, Norwegen, wird ein weiteres MSU-Konzept evaluiert, bei dem die MSU durch speziell geschulte Anästhesiologen betrieben wird^{138,139}. Darüber hinaus existieren erste Daten weiterer Arbeitsgruppen, die die jeweilige Machbarkeit ihres MSU-Konzepts dokumentieren, beispielsweise aus Aurora (Colorado, USA)¹⁴⁰, aus Toledo (Ohio, USA), wo die weltweit erste MSU mit 24h/7d-Service evaluiert wird¹²², und aus New York City (USA)¹⁴¹. In Melbourne (Australien) existiert seit November 2017 eine MSU. Dort wurde eine Fallserie, bestehend aus drei Patienten, beschrieben, bei der die Patienten vor prähospitaler Lyse aufgrund einer Vormedikation mit Dabigatran erfolgreich mit Idarucizumab antagonisiert wurden¹⁴².

In folgenden Städten sind aktuell weitere MSU etabliert bzw. in Planung: Chicago (Illinois, USA), Trenton (New Jersey, USA), Edmonton (Alberta, Canada), Memphis (Tennessee, USA), Doha (Qatar), Bangkok (Thailand), Buenos Aires (Argentinien), Los Angeles (Kalifornien, USA), Phoenix (Arizona, USA), Jacksonville (Florida, USA), Lille (Frankreich), Paris (Frankreich), Leuven (Belgien), Southend (UK), Aarau (Schweiz) und Helsinki (Finnland)^{52,127}. Zur Verbesserung von Zusammenarbeit und Datenaustausch dieser weltweit aktiven wissenschaftlichen Arbeitsgruppen wurde 2016 mit Pre-hospital Stroke Treatment

Organization (PRESTO) ein internationales Konsortium von in der prähospitalen Schlaganfallversorgung aktiven Zentren gebildet⁵². Ziel von PRESTO soll u.a. sein, die prähospitale Schlaganfallversorgung in MSU durch Unterstützung bei zukünftigen Forschungs- und Aufklärungsinitiativen zu stärken und dadurch perspektivisch die Schlaganfallprognose zu verbessern⁵².

Im Folgenden werden offene Fragen aufgeführt, die aktuell in Bezug auf die prähospitale Behandlung von Schlaganfallpatienten an Bord einer MSU ungeklärt sind. Diese offenen Fragen sind die Basis zukünftiger Studien auf diesem wissenschaftlichen Gebiet.

Bei der Diskussion der beiden eigenen Studien zum Einfluss der prähospitalen Lyse auf die Prognose nach ischämischem Schlaganfall wurde bereits darauf eingegangen, dass diese Studien nur erste Hinweise darauf sind, dass die Beschleunigung des Beginns der Lyse beim akuten ischämischen Schlaganfall durch Behandlung in einer MSU mit einer verbesserten Langzeitprognose assoziiert ist. Aufgrund vieler beschriebener Limitationen beider Studien sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese zu erhärten. Die bereits erwähnte BEST-MSU-Studie der Arbeitsgruppe aus Houston ist eine Studie, die zukünftig hoffentlich wird nachweisen können, dass die MSU-Behandlung mit einer verbesserten Schlaganfallprognose korreliert ist¹³³. Eine weitere Studie aus unserer Arbeitsgruppe, die B_PROUD-Studie soll ebenfalls die Frage nach einem besseren prognostischen Ergebnis nach MSU-Behandlung beantworten¹³¹. Es handelt sich hierbei um eine prospektive Studie mit verblindeter Beurteilung des funktionellen Ergebnisses drei Monate nach dem Akutereignis, gemessen mit dem mRS, als primärem Endpunkt. Sekundäre Endpunkte sind u.a. die Häufigkeiten an Lysen und endovaskulären Thrombektomien, die Diagnosen, die Behandlungszeiten und die Beurteilung der Lebensqualität über einen Beobachtungszeitraum von bis zu fünf Jahren. Es werden Patienten mit einem vermuteten Schlaganfall innerhalb eines definierten Ausrückebereichs von Berlin mit einem bekannten Beginn der Symptomatik innerhalb von vier Stunden in die Studie eingeschlossen. Die Patienten werden entweder in den STEMO-Arm eingeschlossen, wenn das STEMO verfügbar ist und zu diesem Patienten ausrückt, oder in den Kontroll-Arm, falls das STEMO nicht verfügbar ist. In dem Fall erfolgt die Aufnahme des Patienten über den konventionellen Rettungsdienst. Das Design dieser Studie ist so konzipiert, dass neben der Bedeutung einer früheren Lyse im STEMO auch der Einfluss der STEMO-Behandlung bezüglich optimierter Triagierung und schnelleren Transfers von Thrombektomie-Kandidaten auf die Langzeitprognose systematisch untersucht wird¹³¹. Anhand von Daten einer Metaanalyse von individuellen Patientendaten aus fünf randomisierten, kontrollierten Studien zur endovaskulären Thrombektomie wissen wir, dass die zusätzliche endovaskuläre Therapie bei Verschluss großer zerebraler Arterien innerhalb eines gegebenen Zeitfensters das Endergebnis gegenüber der Standardtherapie verbessert und dass das Endergebnis umso besser war je früher die endovaskuläre Rekanalisation erreicht wurde¹⁴³. Daher kann also vermutet werden, dass die Beschleunigung der diagnostischen und therapeutischen Schritte für Patienten mit Indikation zur endovaskulären Thrombektomie durch die Behandlung in einer MSU auch für diese Patientengruppe zu einer Prognoseverbesserung führt. Unabhängig davon werden im heutigen Zeitalter der evidenzbasierten Durchführung endovaskulärer Thrombektomien MSU eine zunehmend essentielle Rolle bei der

prähospitalen Triagierung von Patienten mit großen Gefäßverschlüssen in Krankenhäuser mit Interventionsmöglichkeit spielen^{52,127}.

Bislang wurde zur Beurteilung der Effektivität einer MSU-Behandlung von Schlaganfallpatienten zum größten Teil der Einfluss auf die Behandlung des ischämischen Schlaganfalls evaluiert. Aktuell finden sich keine Studien zur Evaluation der prähospitalen Versorgung von Patienten mit intrazerebraler Blutung weder in Bezug auf Prozesszeiten noch hinsichtlich der Prognose. Ein entscheidender Grund hierfür ist sicherlich die Tatsache, dass eine Hirnblutung mit einer Häufigkeit von 10-15% aller Schlaganfälle wesentlich seltener auftritt⁵. Die prähospitalen CT-Diagnostik ermöglicht jedoch bei Patienten mit intrazerebraler Blutung eine optimierte Triagierung hinsichtlich der Auswahl einer geeigneten Zielklinik^{65,144}. Zudem ist es möglich, in Kenntnis des Vorliegens einer intrazerebralen Blutung bereits in der MSU geeignete Maßnahmen zu ergreifen, um das Risiko einer sekundären Nachblutung zu minimieren, wie beispielsweise die intensivste antihypertensive Therapie in den Zielbereich des systolischen Blutdrucks von 140-160 mmHg¹⁴⁵, die Antagonisierung von Marcumar-bedingten Blutungen durch Substitution von PPSB (Prothrombinkonzentrat) oder die Antagonisierung von Dabigatran-bedingten Blutungen durch die Gabe von Idarucizumab. Diese spezifischen Therapiemaßnahmen sind aus empirischer Sicht zeitkritisch, so dass hier ebenfalls ein prognostischer Nutzen bei prähospitalem Therapiebeginn in der MSU vermutet werden kann. Zukünftige Studien werden diese Hypothesen möglicherweise evaluieren.

In einigen Fallserien konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass abgesehen von Patienten mit ischämischem Schlaganfall und intrazerebraler Blutung auch Patienten mit anderen zeitkritischen zerebralen Erkrankungen, wie z.B. SAB¹⁴⁶ oder Schädel-Hirn-Trauma¹⁴⁷ von einer prähospitalen Behandlung in einer MSU profitieren können.

Eine aktuell kontrovers diskutierte Frage betrifft die optimale Einsatzregion für eine MSU. Hierbei sind zwei grundlegende Settings denkbar: Einsatz in einer Metropol-Region vs. Einsatz im ländlichen Raum. Auf den ersten Blick erscheint der Einsatz einer MSU in einer Großstadt vorteilhafter, da hier die Anfahrtswege zum Einsatzort kürzer als im ländlichen Raum sind. Daraus resultieren möglicherweise die stärksten zeitlichen Einsparungen. Auf der anderen Seite sind aber auch Nachteile für Patienten denkbar, die sich in unmittelbarer Nähe von einem Krankenhaus mit Stroke Unit befinden und möglicherweise zu lange auf das Eintreffen der MSU warten müssten. Aber auch der Einsatz im ländlichen Raum hat für die betroffenen Patienten möglicherweise Vorteile, insbesondere, wenn man den Einsatz der MSU im Rendezvous-Prinzip erwägt. Das setzt eine enge Kommunikation zwischen primärem Rettungsmittel und MSU, idealerweise den Einsatz von Telemedizin, voraus. Im Falle des Vorliegens eines behandlungswürdigen Schlaganfalls könnte die MSU dem primären Rettungsmittel entgegen fahren, und die Akutdiagnostik/-therapie findet am Treffpunkt beider Fahrzeuge statt. Nachfolgend wird der Patient in der MSU in die nächstgelegene geeignete Klinik verlegt. Ein Nachteil besteht auch hier für Patienten, die zu lange auf das Eintreffen der MSU warten müssten und in dieser Zeit möglicherweise bereits via primäres Rettungsmittel in der geeigneten Zielklinik eingetroffen wären^{52,127,148}.

Die meisten Daten hinsichtlich optimaler Einsatzregion liegen aktuell sicher für den Einsatz einer MSU in einer Metropol-Region vor und betreffen konkret die Daten des Berliner STEMO. Eine separate Analyse von Daten der PHANTOM-S-Studie untersuchte die Zeiten von Alarm bis Behandlungsbeginn in verschiedenen vordefinierten Einsatzradien des STEMO und kam zu dem Ergebnis, dass in Berlin die Behandlung im STEMO bis zu einer mittleren Anfahrtszeit von 18 Minuten zum Einsatzort mit Zeitersparnis gegenüber der Behandlung im Krankenhaus assoziiert ist¹⁴⁹.

Auch wenn die Frage nach der optimalen Einsatzregion an dieser Stelle aufgrund aktuell unzureichender Datenlage nicht abschließend diskutiert werden kann, so ergeben sich doch für beide denkbaren Szenarien schlüssige Rationen für einen sinnvollen Einsatz sowohl in einer Metropole als auch im ländlichen Raum. Letztendlich ist der Erfolg des MSU-Konzepts unabhängig von der Einsatzregion erheblich von weiteren Einflussgrößen wie beispielsweise der optimalen Einbindung der MSU in das jeweilige Rettungsdienstkonzept, der optimalen Abstimmung der Leitstellenabfragealgorithmen auf den Einsatz einer MSU und der Einbindung der MSU in das Aufnahme- und Verlegungsmanagement der Akutkrankenhäuser abhängig¹⁴⁸.

Trotz aller Vorteile, die das MSU-Konzept durch frühere spezifische Behandlung und bessere Triagierung für den individuellen Patienten bringt, ergeben sich dennoch erhebliche betriebswirtschaftliche Nachteile und Limitationen aufgrund der erheblichen Kosten dieses Konzepts. Unser STEMO ist aufgrund der besonderen Ausstattung mit einem mobilen CT und daraus resultierender zusätzlicher technischer Anforderungen aufgrund strahlenschutztechnischer Regularien deutlich teurer als ein normaler Rettungswagen oder ein Notarzteeinsatzfahrzeug. Darüber hinaus kann das CT im STEMO nur durch einen MTRA bedient werden, dadurch müssen zusätzliche Personalmittel bereitgehalten werden. Auch die regulären Betriebskosten des STEMO sind höher als die anderer Rettungswagen. Dennoch wurde die beiden deutschen MSU-Konzepte unabhängig von einander in zwei unterschiedlichen Studien gesundheitsökonomisch evaluiert^{150,151}. Beide Studien konnten, auf Modellrechnungen basierend, zeigen, dass die MSU in gesundheitsökonomischer Hinsicht kosteneffektiv arbeiten^{150,151}. Dennoch sind beide Studien nur auf der Grundlage von Modellrechnungen entstanden und haben demzufolge eine eingeschränkte Aussagekraft. Zukünftig wird es in Bezug auf die Erstattungsfähigkeit der MSU-abhängigen Kosten durch die Krankenkassen von entscheidender Bedeutung sein, dass gesundheitsökonomische Kosteneffizienz anhand prospektiver Daten zu den realen Kosten für die Etablierung und den Unterhalt einer MSU auf der einen Seite und den volkswirtschaftlichen Nutzen durch Verhinderung behindernder Schlaganfälle auf der anderen Seite gezeigt wird. Aktuell werden auch bereits Studien zur Beantwortung dieser Fragestellungen durchgeführt¹³³. Die Ergebnisse dieser gesundheitsökonomischen Analysen werden entscheidend die Zukunft des MSU-Konzepts in der aktuellen Form bestimmen¹²⁷.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, dass die MSU eine einzigartige wissenschaftliche Plattform darstellt, in der neue diagnostische und therapeutische Modalitäten für Schlaganfallpatienten evaluiert werden können. So eignet sich die MSU beispielsweise durch die Möglichkeit der prähospitalen Blutentnahme hervorragend für die Suche nach

geeigneten Biomarkern für die akute Schlaganfalldiagnostik^{152,153}. Auch die Evaluation neuer Diagnostikkonzepte durch die Verwendung multipler diagnostischer Tools (z.B. automatisierter transkranieller Duplex, Nahinfrarotspektroskopie, Biomarkerdiagnostik, ggf. Mikrowellentechnologie), die perspektivisch das CT in bestimmten Konstellationen ersetzen könnten, sind idealerweise in einer MSU durchführbar.

Zusammenfassend konnte in den beiden in dieser Arbeit zur prähospitalen Schlaganfallbehandlung diskutierten Studien gezeigt werden, dass die Lysetherapie im STEMO mit einer Verbesserung der Langzeitprognose assoziiert zu sein scheint. Diese Prognoseverbesserung wird durch eine erhebliche Verkürzung des Zeitintervalls bis zum Lysebeginn erreicht. Darüber hinaus zeigt sich insbesondere für Patienten mit „Golden Hour“-Lyse ein klarer prognostischer Vorteil, wobei die aktuellen Studiendaten eindeutig darauf hinweisen, dass es nur mit dem MSU-Konzept gelingt, „Golden Hour“-Lysen in relevantem Ausmaß zu realisieren. Zur Konsolidierung dieser ersten präliminären Prognosedaten zum MSU-Konzept müssen die Ergebnisse von randomisierten, kontrollierten Studien abgewartet werden.

4. Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist auch heutzutage noch eine Erkrankung mit erheblichen sozio-ökonomischen Konsequenzen. Gemeinsame Rationale für die in dieser Arbeit vorgestellten Projekte war es, bislang noch nicht etablierte alternative bzw. weiterentwickelte Konzepte für die Behandlung des ischämischen Schlaganfalls zu evaluieren und somit einen möglichen Beitrag für die weitere Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten dieser häufig schicksalhaften Erkrankung zu leisten.

Im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von NO sowie NO-abhängige Mechanismen bei zerebraler Toleranz bzw. IT im frühen und im verzögerten Zeitfenster untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eNOS- und nNOS-abhängiges NO für frühe Toleranz essentiell ist und über eine cGMP-abhängige Signalkaskade vermittelt wird. Darüber hinaus wurde eine Methode zur Untersuchung früher IT am MCAO-Mausmodell mit Verwendung einer transienten globalen Ischämie als präkonditionierendem Stimulus demonstriert. Hingegen spielt bei Toleranz bzw. IT im verzögerten Zeitfenster iNOS-abgeleitetes NO eine wichtige protektive Rolle. Die NO-abhängige Signalkaskade beinhaltet im weiteren Verlauf Peroxynitrit, das Reaktionsprodukt von NO mit NADPH-oxidase-abhängigen Superoxid-Ionen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Induktion von IT neben neuroprotektiven auch vasoprotektive Mechanismen umfasst.

Der klinische Teil dieser Arbeit befasste sich mit der prähospitalen Lysebehandlung von Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall im STEMO. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der prähospitale Beginn der Lyse im Trend mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Überleben ohne Behinderung und einer niedrigeren Mortalität, jeweils nach drei Monaten, assoziiert ist. Zudem ist nach prähospitaler Lyse die Wahrscheinlichkeit für ein Überleben ohne schwere Behinderung nach drei Monaten höher als nach Lysebeginn im Krankenhaus. In einer weiteren Studie zeigte sich insbesondere ein prognostischer Vorteil für Patienten mit „Golden Hour“-Lyse, also mit Lysebeginn innerhalb von 60 Minuten nach Symptombeginn.

Beide Konzepte, zerebrale IT und prähospitale Schlaganfallbehandlung, haben jeweils Potentiale, die aktuell etablierten Therapieprinzipien beim ischämischen Schlaganfall perspektivisch zu ergänzen. Die IT wurde bislang, bis auf vereinzelte klinische Machbarkeitsstudien, im Wesentlichen experimentell evaluiert. In den nächsten Jahren wird sich zeigen, ob die Translation in eine klinische Anwendung gelingt. Das Modell des RIPC ist hierbei ein vielversprechender Ansatz.

Mit der prähospitalen Schlaganfallbehandlung in einer MSU gelingt es neuerdings, Patienten sehr viel früher als bisher zu lysieren. Zudem liegt es auf der Hand, dass auch die Prozesse bis zum Beginn der Thrombektomie und zu weitere spezifischen Behandlungsoptionen beschleunigt werden können. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der frühere Lysebeginn mit einer besseren Langzeitprognose assoziiert zu sein scheint. Sollte sich dieser Trend in den aktuell durchgeführten randomisierten, kontrollierten Studien bestätigen, hätte das MSU-Konzept das Potential, die aktuell etablierte Schlaganfallbehandlung zu revolutionieren. Die größten Hürden auf dem Weg dorthin sind sicherlich die gesundheitsökonomischen Analysen und in diesem Zusammenhang die

Entwicklung von auf jede Versorgungsregion abgestimmten spezifischen Lösungen, um perspektivisch eine flächendeckende prähospitale Schlaganfallbehandlung gewährleisten zu können.

5. Literaturangaben

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2014;383:245-54.
2. Feigin VL, Krishnamurthi RV, Parmar P, et al. Update on the Global Burden of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in 1990-2013: The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology* 2015;45:161-76.
3. Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, et al. Frequency and Care of Stroke in Germany. *Aktuel Neurol* 2010;37:333-40.
4. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, et al. Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* 2006;37:1179-83.
5. Hennerici MG, Kern R, et al. S1-Leitlinie Diagnostik akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2017.
6. Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2014;384:1929-35.
7. Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 2016;387:1723-31.
8. Albers GW, Marks MP, Kemp S, et al. Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N Engl J Med* 2018;378:708-18.
9. Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, et al. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N Engl J Med* 2018;378:11-21.
10. Stroke Unit Trialists C. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;CD000197.
11. Antithrombotic Trialists C. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324:71-86.
12. Juttler E, Schwab S, Schmiedek P, et al. Decompressive surgery for the treatment of malignant infarction of the middle cerebral artery (DESTINY). *Stroke* 2007;38:2518-25.
13. Juttler E, Unterberg A, Woitzik J, et al. Hemispherectomy in older patients with extensive middle-cerebral-artery stroke. *N Engl J Med* 2014;370:1091-100.
14. Adeoye O, Hornung R, Khatri P, Kleindorfer D. Recombinant tissue-type plasminogen activator use for ischemic stroke in the United States: a doubling of treatment rates over the course of 5 years. *Stroke* 2011;42:1952-5.
15. Domino JS, Baek J, Meurer WJ, et al. Emerging temporal trends in tissue plasminogen activator use: Results from the BASIC project. *Neurology* 2016;87:2184-91.
16. Kleindorfer D, de los Rios La Rosa F, Khatri P, Kissela B, Mackey J, Adeoye O. Temporal trends in acute stroke management. *Stroke* 2013;44:S129-31.
17. Schwamm LH, Ali SF, Reeves MJ, et al. Temporal trends in patient characteristics and treatment with intravenous thrombolysis among acute ischemic stroke patients at Get With The Guidelines-Stroke hospitals. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2013;6:543-9.
18. Smith EE, Saver JL, Cox M, et al. Increase in Endovascular Therapy in Get With The Guidelines-Stroke After the Publication of Pivotal Trials. *Circulation* 2017;136:2303-10.

19. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet* 2010;375:1695-703.
20. Hussain M, Moussavi M, Korya D, et al. Systematic Review and Pooled Analyses of Recent Neurointerventional Randomized Controlled Trials: Setting a New Standard of Care for Acute Ischemic Stroke Treatment after 20 Years. *Interv Neurol* 2016;5:39-50.
21. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372:11-20.
22. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 2015;372:1009-18.
23. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372:1019-30.
24. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015;372:2296-306.
25. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* 2015;372:2285-95.
26. Iadecola C, Kahles T, Gallo EF, Anrather J. Neurovascular protection by ischaemic tolerance: role of nitric oxide. *J Physiol* 2011;589:4137-45.
27. Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009;8:398-412.
28. Kunz A, Iadecola C. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handb Clin Neurol* 2009;92:283-305.
29. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994;36:557-65.
30. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:437-48.
31. Dahl NA, Balfour WM. Prolonged Anoxic Survival Due to Anoxia Pre-Exposure: Brain Atp, Lactate, and Pyruvate. *Am J Physiol* 1964;207:452-6.
32. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1283-96.
33. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990;528:21-4.
34. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
35. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 1993;25:3303-4.
36. Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:474-8.
37. Koch S, Della-Morte D, Dave KR, Sacco RL, Perez-Pinzon MA. Biomarkers for ischemic preconditioning: finding the responders. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:933-41.
38. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003;26:248-54.
39. Durukan A, Tatlisumak T. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med* 2010;2:2.
40. Kawano T, Kunz A, Abe T, et al. iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:1453-62.

41. Kunz A, Park L, Abe T, et al. Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci* 2007;27:7083-93.
42. Orio M, Kunz A, Kawano T, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Lipopolysaccharide induces early tolerance to excitotoxicity via nitric oxide and cGMP. *Stroke* 2007;38:2812-7.
43. Speetzen LJ, Endres M, Kunz A. Bilateral common carotid artery occlusion as an adequate preconditioning stimulus to induce early ischemic tolerance to focal cerebral ischemia. *J Vis Exp* 2013:e4387.
44. Huang PL. Nitric oxide and cerebral ischemic preconditioning. *Cell Calcium* 2004;36:323-9.
45. Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* 2017;96:17-42.
46. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
47. Cho S, Park EM, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C. Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:493-501.
48. Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, et al. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 2002;33:1889-98.
49. Atochin DN, Clark J, Demchenko IT, Moskowitz MA, Huang PL. Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke* 2003;34:1299-303.
50. Gomez CR. Editorial: Time is brain! *J Stroke Cerebrovasc Dis* 1993;3:1-2.
51. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.
52. Audebert H, Fassbender K, Hussain MS, et al. The PRE-hospital Stroke Treatment Organization. *Int J Stroke* 2017;12:932-40.
53. Saver JL, Fonarow GC, Smith EE, et al. Time to treatment with intravenous tissue plasminogen activator and outcome from acute ischemic stroke. *JAMA* 2013;309:2480-8.
54. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007;369:275-82.
55. Kohrmann M, Schellinger PD, Breuer L, et al. Avoiding in hospital delays and eliminating the three-hour effect in thrombolysis for stroke. *Int J Stroke* 2011;6:493-7.
56. Meretoja A, Strbian D, Mustanoja S, Tatlisumak T, Lindsberg PJ, Kaste M. Reducing in-hospital delay to 20 minutes in stroke thrombolysis. *Neurology* 2012;79:306-13.
57. Fassbender K, Walter S, Liu Y, et al. "Mobile stroke unit" for hyperacute stroke treatment. *Stroke* 2003;34:e44.
58. Walter S, Kostopoulou P, Haass A, et al. Bringing the hospital to the patient: first treatment of stroke patients at the emergency site. *PLoS One* 2010;5:e13758.
59. Weber JE, Ebinger M, Rozanski M, et al. Prehospital thrombolysis in acute stroke: results of the PHANTOM-S pilot study. *Neurology* 2013;80:163-8.
60. Ebinger M, Lindenlaub S, Kunz A, et al. Prehospital thrombolysis: a manual from Berlin. *J Vis Exp* 2013:e50534.
61. Krebs S, Ebinger M, Baumann AM, et al. Development and validation of a dispatcher identification algorithm for stroke emergencies. *Stroke* 2012;43:776-81.

62. Ebinger M, Winter B, Wendt M, et al. Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;311:1622-31.
63. Walter S, Kostopoulos P, Haass A, et al. Diagnosis and treatment of patients with stroke in a mobile stroke unit versus in hospital: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2012;11:397-404.
64. Ebinger M, Kunz A, Wendt M, et al. Effects of golden hour thrombolysis: a Prehospital Acute Neurological Treatment and Optimization of Medical Care in Stroke (PHANTOM-S) substudy. *JAMA Neurol* 2015;72:25-30.
65. Wendt M, Ebinger M, Kunz A, et al. Improved prehospital triage of patients with stroke in a specialized stroke ambulance: results of the pre-hospital acute neurological therapy and optimization of medical care in stroke study. *Stroke* 2015;46:740-5.
66. Kunz A, Ebinger M, Geisler F, et al. Functional outcomes of pre-hospital thrombolysis in a mobile stroke treatment unit compared with conventional care: an observational registry study. *Lancet Neurol* 2016;15:1035-43.
67. Kunz A, Nolte CH, Erdur H, et al. Effects of Ultraearly Intravenous Thrombolysis on Outcomes in Ischemic Stroke: The STEMO (Stroke Emergency Mobile) Group. *Circulation* 2017;135:1765-7.
68. Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 1999;31:577-96.
69. Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, Zielinska M. Ischaemic preconditioning - Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. *Adv Med Sci* 2017;62:307-16.
70. Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Med Sci Monit* 2011;17:RA44-52.
71. Liu D, Lu C, Wan R, Auyeung WW, Mattson MP. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:431-43.
72. Mayanagi K, Gaspar T, Katakam PV, Kis B, Busija DW. The mitochondrial K(ATP) channel opener BMS-191095 reduces neuronal damage after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:348-55.
73. Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. *J Biol Chem* 2005;280:10040-6.
74. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol* 2000;389:71-8.
75. Horiguchi T, Snipes JA, Kis B, Shimizu K, Busija DW. The role of nitric oxide in the development of cortical spreading depression-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005;1039:84-9.
76. Liu HQ, Li WB, Li QJ, et al. Nitric oxide participates in the induction of brain ischemic tolerance via activating ERK1/2 signaling pathways. *Neurochem Res* 2006;31:967-74.
77. Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, et al. Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:331-40.

78. Lin HY, Wu CL, Huang CC. The Akt-endothelial nitric oxide synthase pathway in lipopolysaccharide preconditioning-induced hypoxic-ischemic tolerance in the neonatal rat brain. *Stroke* 2010;41:1543-51.
79. Zhao P, Peng L, Li L, Xu X, Zuo Z. Isoflurane preconditioning improves long-term neurologic outcome after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Anesthesiology* 2007;107:963-70.
80. Zhao P, Zuo Z. Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology* 2004;101:695-703.
81. Zhao P, Zuo Z. Prenatal hypoxia-induced adaptation and neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent. *Neurobiol Dis* 2005;20:871-80.
82. Chi OZ, Hunter C, Liu X, Weiss HR. The effects of isoflurane pretreatment on cerebral blood flow, capillary permeability, and oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg* 2010;110:1412-8.
83. Wen JY, Chen ZW. Protective effect of pharmacological preconditioning of total flavones of *abelmoschus manihot* on cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Am J Chin Med* 2007;35:653-61.
84. Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Garcia-Yebenes I, et al. Toll-like receptor 4 is involved in neuroprotection afforded by ischemic preconditioning. *J Neurochem* 2009;109:287-94.
85. Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:271-9.
86. Vellimana AK, Milner E, Azad TD, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates endogenous protection against subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke* 2011;42:776-82.
87. Pluta RM. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther* 2005;105:23-56.
88. Dawson DA, Furuya K, Gotoh J, Nakao Y, Hallenbeck JM. Cerebrovascular hemodynamics and ischemic tolerance: lipopolysaccharide-induced resistance to focal cerebral ischemia is not due to changes in severity of the initial ischemic insult, but is associated with preservation of microvascular perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:616-23.
89. Hoyte LC, Papadakis M, Barber PA, Buchan AM. Improved regional cerebral blood flow is important for the protection seen in a mouse model of late phase ischemic preconditioning. *Brain Res* 2006;1121:231-7.
90. Zhao L, Nowak TS, Jr. CBF changes associated with focal ischemic preconditioning in the spontaneously hypertensive rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1128-40.
91. Furuya K, Zhu L, Kawahara N, Abe O, Kirino T. Differences in infarct evolution between lipopolysaccharide-induced tolerant and nontolerant conditions to focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2005;103:715-23.
92. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315-424.
93. Ramdial K, Franco MC, Estevez AG. Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death. *Brain Res Bull* 2017;133:4-11.
94. Klotz LO, Schroeder P, Sies H. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med* 2002;33:737-43.
95. Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest* 1997;99:684-91.

96. Li J, Li W, Altura BT, Altura BM. Peroxynitrite-induced relaxation in isolated canine cerebral arteries and mechanisms of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:176-82.
97. Nossuli TO, Hayward R, Scalia R, Lefer AM. Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats. *Circulation* 1997;96:2317-24.
98. Wei EP, Kontos HA, Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol* 1996;271:H1262-6.
99. Altug S, Demiryurek AT, Kane KA, Kanzik I. Evidence for the involvement of peroxynitrite in ischaemic preconditioning in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2000;130:125-31.
100. Maneen MJ, Cipolla MJ. Peroxynitrite diminishes myogenic tone in cerebral arteries: role of nitrotyrosine and F-actin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H1042-50.
101. Riccio A, Alvania RS, Lonze BE, et al. A nitric oxide signaling pathway controls CREB-mediated gene expression in neurons. *Mol Cell* 2006;21:283-94.
102. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol* 2015;172:1587-606.
103. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 2000;54:2089-94.
104. Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, et al. Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 2004;35:616-21.
105. Weih M, Kallenberg K, Bergk A, et al. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 1999;30:1851-4.
106. Schaller B. Ischemic preconditioning as induction of ischemic tolerance after transient ischemic attacks in human brain: its clinical relevance. *Neurosci Lett* 2005;377:206-11.
107. Della Morte D, Abete P, Gallucci F, et al. Transient ischemic attack before nonlacunar ischemic stroke in the elderly. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008;17:257-62.
108. Johnston SC. Ischemic preconditioning from transient ischemic attacks? Data from the Northern California TIA Study. *Stroke* 2004;35:2680-2.
109. Dezfulian C, Garrett M, Gonzalez NR. Clinical application of preconditioning and postconditioning to achieve neuroprotection. *Transl Stroke Res* 2013;4:19-24.
110. Arboix A, Cabeza N, Garcia-Eroles L, et al. Relevance of transient ischemic attack to early neurological recovery after nonlacunar ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2004;18:304-11.
111. Meller R, Simon RP. A critical review of mechanisms regulating remote preconditioning-induced brain protection. *J Appl Physiol* (1985) 2015;119:1135-42.
112. Peng B, Guo QL, He ZJ, et al. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res* 2012;1445:92-102.
113. Zhao HG, Sun XC, Xian XH, Li WB, Zhang M, Li QJ. The role of nitric oxide in the neuroprotection of limb ischemic preconditioning in rats. *Neurochem Res* 2007;32:1919-26.
114. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der extracraniellen Carotisstenose. 2012. (Accessed 07/26, 2018, at <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/004-028.html>.)
115. Qureshi AI, Feldmann E, Gomez CR, et al. Intracranial atherosclerotic disease: an update. *Ann Neurol* 2009;66:730-8.

- 116.Hirashima Y, Kurimoto M, Takaba M, Endo S, Takaku A. The use of computed tomography in the prediction of delayed cerebral infarction following acute aneurysm surgery for subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 1995;132:9-13.
- 117.Kivisaari RP, Salonen O, Servo A, Autti T, Hernesniemi J, Ohman J. MR imaging after aneurysmal subarachnoid hemorrhage and surgery: a long-term follow-up study. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22:1143-8.
- 118.Rabinstein AA, Friedman JA, Weigand SD, et al. Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2004;35:1862-6.
- 119.Gargiulo G, Sannino A, Stabile E, Perrino C, Trimarco B, Esposito G. New cerebral lesions at magnetic resonance imaging after carotid artery stenting versus endarterectomy: an updated meta-analysis. *PLoS One* 2015;10:e0129209.
- 120.Cronqvist M, Wirestam R, Ramgren B, et al. Diffusion and perfusion MRI in patients with ruptured and unruptured intracranial aneurysms treated by endovascular coiling: complications, procedural results, MR findings and clinical outcome. *Neuroradiology* 2005;47:855-73.
- 121.Zhao W, Meng R, Ma C, et al. Safety and Efficacy of Remote Ischemic Preconditioning in Patients With Severe Carotid Artery Stenosis Before Carotid Artery Stenting: A Proof-of-Concept, Randomized Controlled Trial. *Circulation* 2017;135:1325-35.
- 122.Lin E, Calderon V, Goins-Whitmore J, Bansal V, Zaidat O. World's First 24/7 Mobile Stroke Unit: Initial 6-Month Experience at Mercy Health in Toledo, Ohio. *Front Neurol* 2018;9:283.
- 123.Taqui A, Cerejo R, Itrat A, et al. Reduction in time to treatment in prehospital telemedicine evaluation and thrombolysis. *Neurology* 2017;88:1305-12.
- 124.Bowry R, Parker S, Rajan SS, et al. Benefits of Stroke Treatment Using a Mobile Stroke Unit Compared With Standard Management: The BEST-MSU Study Run-In Phase. *Stroke* 2015;46:3370-4.
- 125.Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* 2008;372:1303-9.
- 126.Kim JT, Fonarow GC, Smith EE, et al. Treatment With Tissue Plasminogen Activator in the Golden Hour and the Shape of the 4.5-Hour Time-Benefit Curve in the National United States Get With The Guidelines-Stroke Population. *Circulation* 2017;135:128-39.
- 127.Fassbender K, Grotta JC, Walter S, Grunwald IQ, Ragooschke-Schumm A, Saver JL. Mobile stroke units for prehospital thrombolysis, triage, and beyond: benefits and challenges. *Lancet Neurol* 2017;16:227-37.
- 128.Tsivgoulis G, Geisler F, Katsanos AH, et al. Ultraearly Intravenous Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke in Mobile Stroke Unit and Hospital Settings: A Comparative Analysis. *Stroke* 2018.
- 129.Tsivgoulis G, Katsanos AH, Kadlecova P, et al. Intravenous thrombolysis for ischemic stroke in the golden hour: propensity-matched analysis from the SITS-EAST registry. *J Neurol* 2017;264:912-20.
- 130.Nolte CH, Ebinger M, Scheitz JF, et al. Effects of Prehospital Thrombolysis in Stroke Patients With Prestroke Dependency. *Stroke* 2018;49:646-51.
- 131.Ebinger M, Harmel P, Nolte CH, Grittner U, Siegerink B, Audebert HJ. Berlin prehospital or usual delivery of acute stroke care - Study protocol. *Int J Stroke* 2017;12:653-8.
- 132.Parker SA, Bowry R, Wu TC, et al. Establishing the first mobile stroke unit in the United States. *Stroke* 2015;46:1384-91.
- 133.Yamal JM, Rajan SS, Parker SA, et al. Benefits of stroke treatment delivered using a mobile stroke unit trial. *Int J Stroke* 2018;13:321-7.

134. Bowry R, Parker SA, Yamal JM, et al. Time to Decision and Treatment With tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Using Telemedicine Versus an Onboard Neurologist on a Mobile Stroke Unit. *Stroke* 2018;49:1528-30.
135. Wu TC, Parker SA, Jagolino A, et al. Telemedicine Can Replace the Neurologist on a Mobile Stroke Unit. *Stroke* 2017;48:493-6.
136. Itrat A, Taqui A, Cerejo R, et al. Telemedicine in Prehospital Stroke Evaluation and Thrombolysis: Taking Stroke Treatment to the Doorstep. *JAMA Neurol* 2016;73:162-8.
137. Cerejo R, John S, Buletko AB, et al. A Mobile Stroke Treatment Unit for Field Triage of Patients for Intraarterial Revascularization Therapy. *J Neuroimaging* 2015;25:940-5.
138. Bache KG, Hov MR, Larsen K, Solyga VM, Lund CG. Prehospital Advanced Diagnostics and Treatment of Acute Stroke: Protocol for a Controlled Intervention Study. *JMIR Res Protoc* 2018;7:e53.
139. Hov MR, Zakariassen E, Lindner T, et al. Interpretation of Brain CT Scans in the Field by Critical Care Physicians in a Mobile Stroke Unit. *J Neuroimaging* 2018;28:106-11.
140. Nyberg EM, Cox JR, Kowalski RG, Vela-Duarte D, Schimpf B, Jones WJ. Mobile Stroke Unit Reduces Time to Image Acquisition and Reporting. *AJNR Am J Neuroradiol* 2018;39:1293-5.
141. Kummer BR, Lerario MP, Navi BB, et al. Clinical Information Systems Integration in New York City's First Mobile Stroke Unit. *Appl Clin Inform* 2018;9:89-98.
142. Zhao H, Coote S, Pesavento L, et al. Prehospital idarucizumab prior to intravenous thrombolysis in a mobile stroke unit. *Int J Stroke* 2018;1747493018790081.
143. Saver JL, Goyal M, van der Lugt A, et al. Time to Treatment With Endovascular Thrombectomy and Outcomes From Ischemic Stroke: A Meta-analysis. *JAMA* 2016;316:1279-88.
144. Kostopoulos P, Walter S, Haass A, et al. Mobile stroke unit for diagnosis-based triage of persons with suspected stroke. *Neurology* 2012;78:1849-52.
145. Hemphill JC, 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2015;46:2032-60.
146. Hov MR, Ryén A, Finsnes K, et al. Pre-hospital ct diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2017;25:21.
147. Schwindling L, Ragoschke-Schumm A, Kettner M, et al. Prehospital Imaging-Based Triage of Head Trauma with a Mobile Stroke Unit: First Evidence and Literature Review. *J Neuroimaging* 2016;26:489-93.
148. Bowry R, Grotta JC. Bringing Emergency Neurology to Ambulances: Mobile Stroke Unit. *Semin Respir Crit Care Med* 2017;38:713-7.
149. Koch PM, Kunz A, Ebinger M, et al. Influence of Distance to Scene on Time to Thrombolysis in a Specialized Stroke Ambulance. *Stroke* 2016;47:2136-40.
150. Dietrich M, Walter S, Ragoschke-Schumm A, et al. Is prehospital treatment of acute stroke too expensive? An economic evaluation based on the first trial. *Cerebrovasc Dis* 2014;38:457-63.
151. Gyrð-Hansen D, Olsen KR, Bollweg K, Kronborg C, Ebinger M, Audebert HJ. Cost-effectiveness estimate of prehospital thrombolysis: results of the PHANTOM-S study. *Neurology* 2015;84:1090-7.
152. Rozanski M, Waldschmidt C, Kunz A, et al. Glial Fibrillary Acidic Protein for Prehospital Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2017;43:76-81.
153. Wendt M, Ebinger M, Kunz A, et al. Copeptin Levels in Patients With Acute Ischemic Stroke and Stroke Mimics. *Stroke* 2015;46:2426-31.

Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die mich in den zurückliegenden Jahren bei der Verwirklichung meiner wissenschaftlichen Projekte gefördert, unterstützt und begleitet haben. Ich bedanke mich bei Takato Abe, Josef Anrather, Heinrich Audebert, Florian Blaschke, Kerstin Bollweg, Ulrich Dirnagl, Martin Ebinger, Matthias Endres, Georg Gahn, Eduardo Gallo, Frederik Geisler, Hélène Girouard, Gabriele Hahn, Claudia Hindinger, Karin Hochrainer, Costantino Iadecola, Takayuki Kawano, Samuel Knauss, Ute Lindauer, Petra Loge, Christian Nolte, Marcello Orio, Laibaik Park, Gianfranco Racchumi, Heinz Reichmann, Munehisa Shimamura, Lukas Speetzen, Joachim Weber und Ping Zhou. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau, Rumi, die mich auf meinem Weg immer bestärkt und mir den Rücken frei gehalten hat.

Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Datum: 02.10.2018

Unterschrift